

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIANE TAGLIARI

EFEITO DO USO DE PROBIÓTICOS VIA ORAL NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
EXCISIONAIS CUTÂNEAS EM RATOS



CURITIBA

2019

ELIANE TAGLIARI

EFEITO DO USO DE PROBIÓTICOS VIA ORAL NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
EXCISIONAIS CUTÂNEAS EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Co-orientadora: Prof. Dra. Thais Andrade Costa Casagrande

CURITIBA

2019

T126 Tagliari, Eliane

Efeito do uso de probióticos via oral na cicatrização de feridas excisionais cutâneas, em ratos [recurso eletrônico] / Eliane Tagliari. – Curitiba, 2019.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Ligoeki Campos

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Andrade Costa Casagrande

1. Cicatrização. 2. Colágeno. 3. Citocinas. 4. Probióticos.  
4. Fator de crescimento transformador beta. I. Campos, Antonio Carlos Ligoeki. II. Casagrande, Thais Andrade Costa. III. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WO185

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA (CLÍNICA  
CIRÚRGICA) - 40001016018P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ELIANE TAGLIARI** intitulada: **EFEITO DO USO DE PROBIÓTICOS VIA ORAL NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS CUTÂNEAS EM RATOS**, sob orientação do Prof. Dr. ANTONIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Dezembro de 2019.

ANTONIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS  
Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

THAIS ANDRADE COSTA CASAGRANDE  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

DANIELA FOJO SEIXAS CHAVES  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ANTONIO SÉRGIO BRENNER  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, presente em todos os momentos da minha Vida.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, orientador, pela sua pronta atenção, disponibilidade e colaboração científica na área Médica e Cirúrgica.

À Professora co-orientadora Dra. Thais de Andrade Costa Casagrande, que colaborou prontamente na execução do experimento com os animais.

À Professora Dra. Lúcia de Noronha e toda a sua equipe do Laboratório de Patologia da PUC/PR, que muito me auxiliou na área de análises e leituras dos resultados.

À equipe do Biotério da Universidade Positivo (UP), pela disponibilidade e atenção, durante todo o período do experimento.

À Professora Taise Fuchs pela disponibilidade e ajuda inestimada na área de Pesquisa Veterinária.

À amiga e doutoranda em clínica cirúrgica Letícia Fuganti Campos pela amizade, auxílio e motivação nas fases difíceis. Obrigada pelo auxílio durante o experimento todo, a leitura dos dados e na elaboração dos artigos relacionados à tese. Que a nossa parceria continue para além do Doutorado.

À minha família, que sempre esteve presente, em especial ao meu marido Alexandre pela tolerância e compreensão, para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa. Ao meu filho Jonas Felipe, pela compreensão e imensurável ajuda com a Yoga e a Meditação para que eu pudesse superar os momentos difíceis da pesquisa.

A todos os outros colaboradores, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À FQM-FARMA( Rio de Janeiro - RJ - Brasil), pelo produto e apoio recebido.

“Quando abro a porta de uma nova descoberta, já encontro DEUS lá dentro...”  
(**Albert Einstein**)



## RESUMO

A pele é uma rede funcional envolvendo microbiota, a barreira física, química e imunológica. Alterações no sistema imune da pele interferem na cicatrização de feridas. Probióticos melhoram a resposta imune intestinal e cutânea, por meio de complexos mecanismos. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito do uso perioperatório de probióticos, via oral, na cicatrização de feridas excisionais cutâneas, em ratos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados 72 ratos, machos Wistar, com peso aproximado de  $250 \pm 26,7$  gramas, procedentes do biotério da Universidade Positivo (UP). Os ratos foram pesados e divididos em 2 grupos com 36 cada, um grupo controle (que recebeu maltodextrina 250 mg/dia) e um grupo probiótico (que recebeu probiótico Probiatop® da FQM-FARMA, na dose de 250 mg/dia, correspondente a dose de 200.000 UFC (unidades formadoras de colônias), administrado via oral, 1 vez ao dia com auxílio de uma espátula, começando 5 dias antes da cirurgia até o dia da eutanásia. Cada grupo foi subdividido em 3 sub-grupos com 12 ratos cada, de acordo com o dia da eutanásia em 3PO, 7PO e 10PO(pós-operatório). Foram avaliados o peso, aspectos macroscópicos, histológicos, colágeno tipo I e tipo III, a expressão de TGF- $\beta$  e as citocinas TNF- $\alpha$ ; IL6 e IL17 da ferida no 3PO; 7PO e 10PO. **RESULTADOS:** Não houve modificação no peso, em ambos os grupos. A contração da ferida foi maior no grupo probiótico, resultando em menor área cruenta no 7ºPO ( $43,4 \pm 5,2$  vs  $47,2 \pm 4,9$  mm<sup>2</sup>;  $p = 0,013$ ). O score geral do HE, incluindo edema, congestão, polimorfonucleares, fibrose, neovasos e monócitos foi menor no grupo probiótico em relação ao controle (Md= -2 a 2 vs Md=-4 a 0;  $p_{3PO} = 0,017$  vs  $p_{7PO} = 0,014$ ). A administração de probióticos resultou em aumento da fibrose do 3ºPO para o 7ºPO ( $p = 0,028$ ). A produção de colágeno tipo I foi maior no grupo probiótico no 10ºPO ( $p = 0,007$ ), e houve aumento do colágeno tipo III no 7ºPO ( $p = 0,014$ ) quando comparado com o controle. A administração de probiótico resultou em maior fibrose e deposição de colágeno e menor área cruenta da ferida em relação ao controle. Com relação às citocinas, quando comparados controle vs probiótico, o grupo probiótico evolui com redução do TNF- $\alpha$  no 3ºPO ( $p = 0,023$ ); houve redução da IL6 no 7ºPO ( $p = 0,003$ ) e houve redução da IL17 no 3ºPO ( $p = 0,039$ ) e no 7ºPO ( $P = 0,024$ ). O TGF- $\beta$  foi menor no 10ºPO ( $p = 0,031$ ) no grupo probiótico. Os resultados encontrados sugerem que o uso de probiótico atenuou a resposta inflamatória, por diminuir a expressão das citocinas pró-inflamatórias. Quanto ao TGF- $\beta$ , este aumentou em ambos os grupos, uma vez que uma de suas

funções é organizar a matriz provisória por meio do gradiente quimiostático e orientar a organização das fibras, o que pode ser confirmado com o aumento da fibrose no 7ºPO. Entretanto a expressão de TGF- $\beta$  foi significativamente menor no 10ºPO no grupo probiótico, sugerindo que neste grupo o processo cicatricial já estava em fase final neste período. **CONCLUSÃO:** A administração oral de probióticos atenua a fase inflamatória das feridas, possivelmente por acelerar o processo de fibrose e a deposição de colágeno. Antecipa a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF- $\alpha$  e acelera a redução de IL17 e TGF- $\beta$ , resultando em cicatrização organizada e madura em menos tempo.

**Palavras chave:** cicatrização cutânea, colágeno, citocinas, probióticos, TGF- $\beta$ .



## ABSTRACT

The skin is a functional network that surrounds microbiota, the physical, chemical and immunological barrier. Changes in the immune system of the skin may interfere with wound healing. Probiotics improve the intestinal and skin immune response through complex mechanisms. **OBJECTIVE:** To evaluate the effect of perioperative oral administration of probiotics on the cutaneous healing/scarring process in rats **MATERIAL AND METHODS:** Seventy-two male Wistar rats, weighing approximately  $250 \pm 26,7$  grams, from the Positivo University (UP) were used. The rats were weighed and divided into 2 groups with 36 animals each, one control group (receiving maltodextrin 250 mg/day) and one probiotic group (receiving Probiatop® from FQM-FARMA), at a dose of 250 mg/day, which corresponds to 200,000 CFU (colony forming units) administered orally once a day with the aid of a spatula, starting 5 days before surgery until the day of euthanasia. Each group was subdivided into 3 groups of 12 rats each according to the day of euthanasia at 3<sup>th</sup> PO, 7<sup>th</sup> PO and 10<sup>th</sup> PO. Weight, macroscopic and histological aspects, TGF- $\beta$  expression and cytokines TNF- $\alpha$ ; and IL6 and IL17 in the wound at 3<sup>th</sup> PO, 7<sup>th</sup> PO and 10<sup>th</sup> PO day were evaluated. **RESULTS:** There was no significant weight change in either group. The contraction of the wound was greater in the probiotic group when compared to the control, resulting in a smaller wound area in the, 7<sup>th</sup>PO day ( $43.4 \pm 5.2$  vs  $47.2 \pm 4.9$ mm<sup>2</sup>;  $p = 0.013$ ). Histologically the overall HE score including edema, congestion, polymorphnuclear, fibrosis, neovascular and monocytes was lower in the probiotic group as compared to controls ( $Md = -2$  to  $2$  vs  $Md = -4$  to  $0$ ;  $p_{3PO} = 0.017$  vs  $p_{7PO} = 0.014$ ). Probiotic administration resulted in increased fibrosis from the 3<sup>th</sup> PO to 7<sup>th</sup> PO day ( $p = 0.028$ ). Type I collagen production was higher in the probiotic group at 10<sup>th</sup>PO day ( $p = 0.007$ ), and there was an increase in type III collagen at the 7<sup>th</sup>PO day ( $p = 0.014$ ) when compared to controls. Therefore, probiotic administration resulted in increased fibrosis and collagen deposition and smaller wound area as compared to the control group. Regarding cytokines, when compared control vs probiotic, the probiotic group presented reduction in TNF-a expression in the 3<sup>th</sup> PO day ( $p = 0.023$ ); a reduction in IL6 at 7<sup>th</sup> PO day ( $p = 0.003$ ). and reduction in IL17 in the 3<sup>th</sup> PO day ( $p=0,039$ ) e no 7<sup>th</sup>PO day ( $P=0,024$ ).. TGF- $\beta$  was lower at 10<sup>th</sup> PO day ( $p = 0.031$ ) in the probiotic group. The results suggest that the use of probiotics attenuated the inflammatory response by decreasing the expression of

proinflammatory cytokines. As for TGF- $\beta$ , it increased in both groups, since one of its functions is to organize the provisional matrix through the chemostatic gradient and guide the fiber organization, which can be confirmed by the increase in fibrosis in the 7<sup>th</sup> PO found here. However, TGF- $\beta$  expression was significantly lower at 10<sup>th</sup> PO in the probiotic group, suggesting that in this group the healing process was already in its final phase in this period. **CONCLUSION:** Oral administration of probiotics attenuates the inflammatory phase of the wounds, possibly by accelerating the fibrosis process and collagen deposition. Attenuates the expression of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF<sub>alpha</sub> and accelerating the reduction of IL17 and TGF-beta, resulting in a better mature and organized healing.

**Keywords:** cutaneous healing, collagen, cytokines, probiotics, TGF- $\beta$ .

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	34
FIGURA 2 - EXEMPLO DO MÉTODO UTILIZADO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO PROBIÓTICO. ....	35
FIGURA 3 - EXEMPLO DE TRICOTOMIA DA REGIÃO DORSAL DO ANIMAL E MARCAÇÃO COM MOLDE QUADRADO DE 2,0CM X 2,0CM. ....	36
FIGURA 4 - EXEMPLO DE HE DO GRUPO PROBIÓTICO (LETRAS A, B E C) E DO GRUPO CONTROLE (LETRAS D, E, E F) 3º PO, 7º PO E 10º PO DE PÓS-OPERATÓRIO, RESPECTIVAMENTE. OBSERVA-SE A PRESENÇA DE MONÓCITOS, NEOVASOS, FIBROSE E POLIMORFOS NUCLARES. AUMENTO 20X. ....	38
FIGURA 5 - EXEMPLOS DE LÂMINAS CORADAS EM VERMELHO-ALARANJADO (COLÁGENO TIPO I, MADURO), E AS FIBRAS MAIS FINAS, DISPERSAS, FRACAMENTE BIRREFRINGENTES, CORAM-SE DE TONS VERDES (COLÁGENO TIPO III, IMATURO), RESPECTIVAMENTE. AUMENTO 20X. ....	39
FIGURA 6: EXEMPLO DE LEITURA DA DENSITOMETRIA DO COLÁGENO TÉCNICA DE <i>PICROSIRIUS-RED F3BA</i> (PSR). E TAMBÉM A ANÁLISE E O CÁLCULO DAS ÁREAS, EM MILÍMETROS QUADRADOS, FORAM REALIZADOS PELO PROGRAMA IMAGE-PRO® PLUS (VERSÃO 4.5. MEDIA CYBERNETICS, ROCKVILLE, MARYLAND, ESTADOS UNIDOS) ....	40
FIGURA 7 - EXEMPLO DE BLOCOS DE <i>TISSUE MICROARRAY</i> , SELEÇÃO DAS ÁREAS ESCOLHIDAS E COLETA DO MATERIAL.....	41
FIGURA 8 - EXEMPLOS DE IMAGENS DAS CITOCINAS IL6, IL17, TNF-A E DO FATOR DE CRESCIMENTO TGF-B,. FOTOMICROGRAFIAS COM AUMENTO DE 20X, ....	42
FIGURA 1 - DESENHO DO ESTUDO.....	51
FIGURA 2 – NOS TEMPOS 3PO, 7PO E 10PO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE (C) E PROBIÓTICO (P): A) GRÁFICO MOSTRANDO A QUANTIDADE DE FIBROSE; B) GRÁFICO MOSTRANDO EVOLUÇÃO HISTOLÓGICA CELULAR; C) GRÁFICO MOSTRANDO A ÁREA DO TECIDO DA FERIDA (MM <sup>2</sup> ), NOS TEMPOS 3PO, 7PO E 10PO .....	55
FIGURA3 EVOLUÇÃO HISTOLÓGICA (EDEMA, CONGESTÃO, POLIMORFONUCLEARES, FIBROSE, NEOVASCULARIZAÇÃO E MONÓCITOS)	

ENTRE CONTROLE E PROBIÓTICO: A E B) 3PO A = CONTROLE, B = PROBIÓTICO; C E D) 7PO C = CONTROLE; D = PROBIÓTICO); E E F) 10PO E = CONTROLE E F = PROBIÓTICO .....	56
FIGURA 4 – EXEMPLO DE EVOLUÇÃO HISTOLÓGICA (EDEMA, CONGESTÃO, POLIMORFONUCLEARES, FIBROSE, NEOVASCULARIZAÇÃO E MONÓCITOS) EM AMBOS OS GRUPOS CONTROLE E PROBIÓTICO NOS DIAS 3PO (A E B), 7PO (C E D) E 10PO (E E F) .....	57
FIGURE 1. EVOLUTION OF FIBROSIS IN CONTROL GROUP (C) AND PROBIOTIC (P); (MEDIAN 25% 75%) AT POSTOPERATIVE DAYS 3, 7 AND 10 (* P = 0.028)..	76
FIGURE 2: EXAMPLE OF EVOLUTION OF WOUND CONTRACTION AND AREA CALCULATION AT 3PO, 7PO AND 10PO RESPECTIVELY. ....	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NA LEITURA HISTOLÓGICA (VIZZOTO JUNIOR AO E TAL, 2003). .....	38
TABELA 1 – AVALIAÇÃO DE COLÁGENO I E COLÁGENO III (NA ÁREA TOTAL), EXPRESSOS EM MM <sup>2</sup> , NOS GRUPOS CONTROLE E PROBIÓTICO, NOS TEMPOS 3PO,7PO E 10 PO. ....	57
TABLE 1. EVALUATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF <sub>ALPHA</sub> ) AND EVALUATION OF EXPRESSED IL6 ( MEAN ± STANDARD DEVIATION) IN WOUND AREA (IN M <sup>2</sup> ) IN BOTH CONTROL AND PROBIOTIC GROUPS ON POSTOPERATIVE DAYS 3, 7 AND 10.....	78
TABLE 2. EVALUATION OF EXPRESSED INTERLEUKIN 17 (IL17) AND EVALUATION OF EXPRESSED TGF <sub>BETA</sub> (MEAN ± STANDARD DEVIATION) IN THE WOUND AREA ( IN M2), ANALYZING THE CONTROL AND PROBIOTIC GROUPS AT POSTOPERATIVE DAYS 3, 7 AND 10. ....	79
TABELA 3 – TABELA DE COMPOSIÇÃO DIETA PADRÃO. * .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MMPs	- Metaloproteinases
TGF $\beta$	- Fator de crescimento de transformação beta
PDGF	- Fator de crescimento derivado das plaquetas
FGF	- Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
EGF	- Fator de crescimento epidérmico
TNF $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
IL 6	- Interleucina 6
Th17	- Linfócito T Helper 17
IL17	- Interleucina 17
MI	- Microbiota Intestinal
TLRs	- Receptores Tipo <i>Toll-like</i>
NODs	- Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
PAMPs	- Padrões moleculares associados a Patógenos
DAMPs	- Danos Moleculares
LPSs	- Lipopolissacarídeos
PG	- Peptídeoglicanos
PPRs	- Receptores de reconhecimento tipo R
TREGs	- <i>Treg Thymic Cells</i>
IL10	- Interleucina 10
RNA <sub>m</sub>	- Ácido Ribonucleico Mensageiro
AMPs	- Peptídeos Antimicrobianos
LTA	- Ácido Lipoteóico
LAB	- Bactérias ácido lácticas
EC	- Células Epiteliais
DCs	- Células Dendríticas
LGs	- Células de Langerhans
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	- Comissão de Ética do uso de Animais
3PO	- Terceiro dia de pós-operatório
7PO	- Sétimo dia de pós-operatório
10PO	- Décimo dia de pós operatório

C	- Grupo Controle
P	- Grupo Probiótico
HE	- Hematoxilina-Eosina (HE)
PSR	- <i>Picrosirius-red F3BA</i>
LPC-37	- <i>Lactobacillus paracasei</i> 37
HN0019	- <i>Bifidobacterium lactis</i>
HN001	- <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
NCFM®	- <i>Lactobacillus acidophilus</i>
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
pH	- Potencial Hidrogeniônico
NMF	- Fator de Hidratação Natural"
MEC	- Matriz extra celular
TJ	- <i>Tight Junctions</i>
μ²	- Micrômetro quadrado
Mm	- Milímetros quadrados
MD	- Média e desvio Padrão
OMS	- Organização mundial da Saúde
WGO	- Organização Mundial de Gastroenterologia



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 A PELE	16
2.2 A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	16
2.3 O COLÁGENO	18
2.4 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO	19
2.5 PROBIÓTICOS	20
2.6 CONEXÃO INTESTINO E PELE	22
2.7 PROBIÓTICOS E OUTROS EFEITOS NA PELE (ESTUDOS EXPERIMENTAIS VIA TÓPICA E ORAL)	25
2.8 PROBIÓTICOS E CICATRIZAÇÃO	26
2.9 PROBIÓTICOS E CICATRIZAÇÃO (ESTUDOS EXPERIMENTAIS USO TÓPICO E ORAL)	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1 MODELO EXPERIMENTAL, ASPECTOS BIOÉTICOS	32
3.2 DIETAS ESCOLHIDAS	32
3.3 GRUPOS DE PESQUISA	33
3.3.1 Morbidade e Mortalidade	34
3.3.2 Controle do Peso	34
3.3.3 Administração do Probiótico ou Placebo	34
3.3.4 Anestesia	35
3.3.5 Procedimento Cirúrgico	35
3.3.6 Análise Macroscópica	36
3.3.7 Eutanásia	36
3.3.8 Análise Histológica	37
3.3.9 Densitometria do Colágeno	38
3.3.10 Estudo Imunohistoquímico	40
3.3.11 Análise Estatística	42
<b>4 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	<b>44</b>

4.1 ARTIGO 1 .....	45
4.2 ARTIGO 2 .....	67
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO 2 – ADENDO AO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO 3 – LAUDO DESCRITIVO DA RAÇÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 4 – TERMO DE DOAÇÃO .....</b>	<b>106</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é um ecossistema composto por 1,8 m<sup>2</sup> de tecido que recobre todo o corpo, rica em dobras, anexos cutâneos e contém uma microbiota diversificada (KOMATSU *et al.*, 2005). Análises moleculares avançadas da microbiota cutânea revelaram alta diversidade e especificidade conforme o local do corpo que se encontram (DETHLEFSEN, *et al.*, 2007).

A cicatrização é um processo celular dinâmico que envolve eventos moleculares e bioquímicos visando a reconstituição tecidual (CAMPOS, GROTH e BRANCO, 2008). A microbiota da pele também exerce papel fundamental na resposta imune, e as alterações na mesma, podem interferir na cicatrização de feridas (MEISEL, *et al.*, 2018). Identificar correlações entre perfis específicos da microbiota, o uso de probióticos e todos os fatores que afetam a sua homeostase relacionados à cicatrização de feridas, pode levar a melhores resultados clínicos (MEISEL, *et al.*, 2018). A investigação da cicatrização necessita de várias maneiras de quantificação do processo cicatricial. Este processo pode ser avaliado com parâmetros clínicos, mecânicos, bioquímicos e histológicos (CAMPOS, GROTH e BRANCO 2008). A via de utilização de probióticos na cicatrização de feridas têm sido a aplicação tópica, porém estudos utilizando a administração oral de probióticos tem apontado ser uma nova abordagem para melhora da cicatrização cutânea. O equilíbrio simbiótico entre a microbiota intestinal e a cutânea parece contribuir no processo de cicatrização da pele, por meio do uso oral de probióticos.

### 1.1 OBJETIVOS

#### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do uso perioperatório de probióticos, via oral, na cicatrização de feridas excisionais, cutâneas em ratos.

#### 1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar no 3º, 7º e 10º dias pós operatório os seguintes parâmetros:

- Evolução do peso corporal;
- Avaliar macroscopicamente o processo cicatricial por medida digital da contração das feridas excisionais dorsais;
- Avaliar a deposição na ferida do colágeno neoformado, tipo I e tipo III ;
- Avaliar histologicamente, com coloração por Hematoxilina-Eosina (HE), parâmetros histológicos agudos e crônicos e o grau de cicatrização da ferida;
- Mediante estudo imunoistoquímico, avaliar a expressão dos seguintes marcadores:
  - Interleucina-6 (IL6),
  - Interleucina-17 (IL17),
  - Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e
  - O fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A PELE

A pele compreende o maior órgão do corpo humano e cobre toda a sua superfície. Formada pela epiderme, derme e tecido adiposo subcutâneo, a pele tem múltiplas funções, entre as quais função de barreira física, química, imunológica (KOMATSU *et al.*, 2005; NGUYEN, SOULIKA, 2019).

A epiderme é formada por uma rede de envelopes celulares cornificados, reticulados e moléculas lipídicas especializadas, todos organizados em camadas e cheia de invaginações, incluindo glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas que abrigam um vasto universo de microorganismos.(STANFORD *et al.*, 2013; GALLO *et al.*, 2017). Na epiderme, encontram-se as células apresentadoras de antígenos, ou células de Langerhans (LGs) que migram para os linfonodos regionais quando ativadas por patógenos externos, caracterizando a sua importância imunológica (COLE *et al.*, 2010).

A derme contém a intercessão das fibras de colágeno e fibras elásticas. Abriga os fibroblastos, miofibroblastos e células imunes como macrófagos, linfócitos e mastócitos. Os fibroblastos sintetizam uma matriz extracelular composta por colágeno, proteoglicanos e fibras elásticas que garantem a integridade estrutural da derme (NGUYEN, SOULIKA, 2019).

Alterações nas camadas da pele, levam à uma série de respostas inflamatórias e imunológicas que visam o reparo da lesão e a cicatrização normal da mesma (COLE *et al.*, 2010).

Subjacente à derme está o tecido adiposo subcutâneo que armazena energia na forma de ácidos graxos e funciona como um órgão endócrino. Essa camada também produz uma variedade de mediadores, como fatores de crescimento, adipocinas e citocinas, e contém várias células imunes. Além disso, a gordura subcutânea serve como uma camada isolante e de sustentação para a pele (NGUYEN, SOULIKA, 2019).

### 2.2 A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

A reparação da integridade dos tecidos ocorre pela regeneração e cicatrização em resposta a traumas e lesões sofridas. A cicatrização cutânea é um processos fisiológicos que envolve eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

Segundo CLARK (2005), existem três fases divididas didaticamente, em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e a fase de remodelamento ou maturação, que ocorrem simultânea e fisiologicamente superpostas.

Após a lesão tecidual, inicia-se a fase inflamatória que é proporcional em intensidade ao dano causado ao tecido e perdura em torno de quatro dias. O colágeno exposto ativa a cascata da coagulação e o sistema do complemento. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação, que liberam grânulos que contêm fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanos. A quimiotaxia leva à migração de neutrófilos para a ferida em até 24 horas após a lesão. Estes aderem-se à parede do endotélio, ligam-se com as selectinas (receptores de membrana), e produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. Os macrófagos secretam citocinas e fatores de crescimento que contribuem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais na transição para a fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006b; MEYER, *et al.*, 2012).

Por volta do terceiro ou quarto dia após o trauma começa a fase proliferativa ou de regeneração, que é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno e sua duração é de aproximadamente 14 dias. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) estimula a angiogênese, cuja etapa final desta fase é a formação de tecido de granulação. Fibroblastos circundantes migram para a ferida, são ativados por fatores de crescimento como o PDGF e o TGF- $\beta$ , que estimulam os fibroblastos a produzirem colágeno. Os fibroblastos surgem, atraídos por quimiotaxia, através de mediadores inflamatórios liberados por plaquetas, leucócitos e macrófagos. Iniciam a síntese e a secreção de componentes da matriz extracelular e de fatores de

crescimento que continuam a estimular a cicatrização. Nesta fase ocorrem a neovascularização e a reepitelização, bem como a contração tecidual realizada pelos miofibroblastos. A contração é responsável pela diminuição do tamanho da lesão e redução do tempo de epiteliação (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

Os miofibroblastos apresentam características de células musculares lisas e são responsáveis pela aproximação das bordas da ferida mediante o avanço do tecido sadio de maneira centrípeta à lesão. O tecido formado pela proliferação vascular e pela matriz extracelular sintetizada pelo fibroblasto recebe o nome de tecido de granulação e apresenta aspecto granuloso e avermelhado (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

A fase mais importante é a de maturação/remodelamento, onde acontece a deposição de colágeno de maneira organizada. Dois momentos distintos acontecem: a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a regressão endotelial. Tem início a partir do oitavo dia e prolonga-se até o sexto mês ou mais. É nesse período que a força tênsil da cicatriz aumenta até atingir seu platô de maturação, em torno de um ano de evolução. Esta reorganização é muito importante para a cicatrização. A ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã e até um ano após a força tênsil jamais retornará completamente, atingindo apenas 80% após três meses. (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a; CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

## 2.3 O COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo. Formado por fibras helicoidais, com sequência tri-peptídica, composta de glicina-X-Y, sendo X representado pela prolina e Y pela hidroxiprolina. A degradação do colágeno inicia-se imediatamente após a lesão e está aumentada durante a cicatrização por collagenases específicas e metaloproteinases (MMPs). A atividade destas é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. A formação da matriz extracelular é resultante de balanço entre a deposição (síntese) e degradação de colágeno (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente



na pele normal, e tem orientação paralela à pele. O colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso (tipo I) é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão, refletindo em aumento da força tênsil da ferida. Esta reorganização é muito importante para a aparência e qualidade da cicatrização. Sua produção atinge seu pico máximo por volta do 21º dia, continuando depois, de forma menos intensa em até um ano após a lesão (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006<sup>a</sup>; CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

## 2.4 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), uma citocina pró-inflamatória, é gerado principalmente por macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Desempenha papel crucial na resposta inflamatória e na imunidade inata. Na fase inicial da cicatrização, o TNF- $\alpha$  é induzido e recruta outras células inflamatórias para o local da lesão. (AYDEMIR, *et al.* 2011; LAM, *et al.* 2012).

A Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica com múltiplos efeitos. A IL-6 é gerada em resposta a fatores de estresse ambiental, como infecções e lesões teciduais. Essa expressão aciona um sinal de alarme e ativa os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o estresse. (MASASHI *et al.*, 2014).

A Interleucina 17 (IL-17) induz uma ampla resposta tecidual que leva ao tráfico de neutrófilos para o local da inflamação (KORN *et al.*, 2009). Descobriu-se que a maioria das células IL17 reside nos tecidos de barreira, incluindo o trato respiratório e intestinal, bem como a pele. TGF- $\beta$  e IL-6 trabalham juntos para induzir a diferenciação de Th17 em IL17 ativa (MANGAN, *et al.*, 2006; KORN *et al.*, 2007, 2009).

O TGF- $\beta$  é um fator de crescimento multifuncional que exerce efeitos pleiotrópicos na cicatrização de feridas, regulando a proliferação, migração celular, diferenciação, produção de MEC e a resposta imune. É um dos fatores mais importantes no reparo do tecido conectivo e na regeneração óssea, em todos os seus estágios, além de sua importância em ser um dos primeiros a iniciar o processo de cicatrização. Promove a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e monócitos para a lesão (SCHILLER, *et al.*, 2004; PENN, *et al.*, 2012; FINNISON, *et al.*, 2013; MICHAEL LICHTMAN *et al.*, 2016).

## 2.5 PROBIÓTICOS

Elie Metchnikoff (1907), cientista russo, prêmio Nobel e professor do Instituto Pasteur em Paris, postulou há mais de um século, que as bactérias ácido-lácticas (LAB) ofereciam benefícios à saúde e levavam à longevidade. Em 1917, Alfred Nissle isolou uma cepa não patogênica de *Escherichia coli* Nissle1917, e constitui um dos poucos exemplos de um probiótico não LAB (METCHNIKOFF, 1907; WGO, 2017).

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais usadas como probióticos, mas a levedura *Saccharomyces boulardii* e algumas espécies *E. coli* e *Bacillus* também são usadas. Os novos agentes incluem também *Clostridium butyricum*, aprovado recentemente como novo alimento na União Europeia. Podem ainda conferir benefícios à saúde do hospedeiro os prebióticos, simbióticos e os pós-bióticos que serão definidos a seguir (HILL *et al.*, 2014; WGO, 2017).

Prebióticos são fibras fermentáveis que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal. Dentre as fibras fermentáveis classificadas como prébióticas podem ser citadas inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-olissacarídeos (GOS) entre outras.

Simbióticos são produtos que associam prebióticos e probióticos na mesma formulação, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro (WGO, 2017).

Pós-bióticos são fragmentos ativos produzidos por probióticos. Os pós-bióticos, na forma de lisados proteicos, obtidos de cepas com elevadas concentrações de unidades formadoras de colônia (UFC) ganharam importância especial na resposta imune inata do hospedeiro (CHRISTENSEN GJ, BRÜGGEMANN H., 2014).

Os probióticos vêm sendo estudados para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo na cicatrização cutânea, na prevenção e manejo do diabetes, nas infecções do trato respiratório; e em vários distúrbios gastrointestinais

(GI), infecção urogenitais entre outras (WGO, 2017).

Nas últimas duas décadas foram publicados inúmeros estudos revelando o impacto que o microbioma - bactérias, vírus e fungos - têm sobre a fisiologia e o metabolismo do hospedeiro. O tópico de pesquisa (WGO, 2017) já alcançou distinção, com uma média de mais de 3 citações por artigo e um total de mais de 60.000 visualizações e 8.200 downloads de artigos. Apesar desses estudos serem heterogêneos no que se refere às cepas, probióticos analisados e populações incluídas, a evidência acumulada apoia a ideia de que os benefícios são mensuráveis em muitos parâmetros (HILL *et al.*, 2014, WGO, 2017).

Segundo VAN NOOD *et al.*, (2013) modular o ecossistema microbiano utilizando probióticos de diferentes espécies, envolve diferentes estratégias que podem ser:

1. Competição com bactérias patogênicas por nutrientes e sítios de ligação na célula hospedeira;
2. Inativação de toxinas e seus metabólitos;
3. Produção de substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de microrganismos patológicos;
4. Estimulação/modulação da resposta imune do hospedeiro, envolvendo células epiteliais (EC), células dendríticas (DC) e linfócitos T reguladores, tanto no trato gastrointestinal como na pele.
5. Produção de muco protetor, através do aumento da atividade de mucinas.
6. Competição pela adesão de patógenos.
7. Fagocitação de radicais superóxidos (WHO, 2017)

O gênero dos *Lactobacillus* possui 148 espécies reconhecidas (KLEEREBEZEM, *et al.*, 2010). Conhecidas como *Lactobacillus acidophilus* compreende 6 espécies distintas e pertencem ao grupo de bactérias ácido-láticas (LAB). São gram-positivas, não formadoras de esporos e são residentes naturais do trato gastrointestinal, da cavidade oral e da vagina. Algumas espécies de LAB, tais como a cepa *Lactobacillus rhamnosus* HN001 agem na modulação imunológica do hospedeiro. Já o *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus lactis* e *Bifidobacterium spp.* são importantes na manutenção da homeostase intestinal e cutânea durante o processo de cicatrização. (JONG-HWA, *et al.*, 2019).

O gênero *Bifidobacterium* compreende mais de 40 espécies diferentes, que 90% de bactérias anaeróbias em lactentes. A cepa *Bifidobacterium lactis* HN0019, apresenta-se como uma das bifidobactérias mais resistentes às secreções ácidas e à bile, além de apresentar grande capacidade de adesão à mucosa (ANDRIAN TSOANIRINA, *et al.* 2013).

Estudos de cicatrização de feridas têm sido focados principalmente na aplicação tópica de probióticos demonstrando melhora na cicatrização de feridas através da redução da carga bacteriana e aumento da reparação tecidual em modelos de ferida de roedores ((NAIK, S. *et al.*, (2015).

A capacidade de diferenciar cepas é importante, pois estudos revelam que existem diferenças funcionais entre as cepas dentro de uma mesma espécie (NAIK, *et al.* (2015).

Além dos efeitos tópicos sobre a barreira cutânea, os probióticos usados via oral podem influenciar a microbiota intestinal (MI) e comensal e modular a cicatrização de feridas através dos efeitos sobre a imunidade sistêmica, maior absorção de nutrientes e modulação do eixo intestino-cérebro-pele (NAIK, *et al.* (2015).

Serão discutidos a seguir os possíveis mecanismos envolvidos.

## 2.6 CONEXÃO INTESTINO E PELE

A homeostase molecular de um organismo é o produto de interações complexas entre todos os microbiomas existentes e seus metabólitos. (SANDRINE , CLAUS, JONATHAN, 2013). A microbiota intestinal (MI) apresenta grande variabilidade genética, porém, alguns filos são comuns dos seres humanos em níveis taxonômicos, como os filos dominantes (*Bacteroidetes* e *Firmicutes*), que estão sempre presentes em pelo menos 40% dos indivíduos (HILL COLLIN *et al.*, 2014).

PASOLI *et al.* (2019) em seu trabalho, explorando tecnologias de análises metagenômicas, expandiram a coleção de genomas microbianos associados ao microbioma humano em mais de 150.000 genomas recém-reconstruídos. Os resultados do estudo enfatizam a diversidade filogenética e funcional do microbioma

humano, sobretudo em populações não ocidentais, mostrando que este não está totalmente conhecido, abrindo direções para novos estudos (PASOLI *et al.*, 2019).

Já a pele é colonizada por um conjunto variado de microorganismos benéficos, neutros e/ou patogênicos. Além de complexa e diversificada, a microbiota cutânea é constituída por microorganismos transitórios ou residentes (DETHLEFSEN, *et al.* 2007). A pele apresenta um ecossistema rico em componentes biológicos vivos e presentes em diferentes locais, formando um delicado equilíbrio entre hospedeiro e microorganismos. Esta relação simbiótica é fundamental na modulação da resposta imune e na cicatrização cutânea.

Bactérias ácido lácticas (LAB) e Bifidobactérias agem nas células epiteliais (ECs) inibindo diretamente o crescimento de patógenos e induzem a resposta imune e mecanismos de reparo tecidual cutâneo (HILL COLLIN *et al.*, 2014).

Em comparação com o ambiente intestinal, a pele não possui muitos nutrientes além das proteínas e lipídios básicos. Para sobreviver em um clima tão frio, ácido e dessecado, a microbiota residente da pele humana se adaptou para utilizar os recursos presentes no suor, no sebo e no extrato córneo (SCHARSCHMIDT, FISCHBACH, 2013).

O estresse modifica o equilíbrio e leva à perda da homeostase na microbiota intestinal e cutânea (GALLEY *et al.* 2014). Fatores exógenos como clima, localização geográfica; estilo de vida; tipo de ocupação, hábitos de higiene, bem como os fatores endógenos como sexo, idade, local da pele; polimorfismos no gene da filagrina; diabetes, lesões e doenças auto-imunes podem alterar a microbiota da pele (FIERER *et al.*, 2014).

A colonização bacteriana da pele humana começa no momento do parto e continua ao longo dos primeiros anos de vida. Bebês nascidos de parto vaginal tem a microbiota cutânea semelhantes a microbiota vaginal da mãe, e os que nasceram por cesariana, tem a microbiota cutânea, similar à pele da mãe. (GRICE *et al.*, 2008, 2010, 2011 e 2015).

Comunidades microbianas contribuem para estabilizar a homeostase cutânea e modular a resposta imune inata. OH *et al.* (2012), mostrou que ocorrem mudanças significativas na microbiota da pele, em diferentes locais, associada com a maturação sexual progressiva medida pela escala de Tanner.

Em seu trabalho, GRICE *et al.* (2015), demonstraram que 97% do

sequenciamento genético da pele saudável em humanos e ratos pertenciam a seis tipos de bactérias. Eles utilizaram para este levantamento todas as profundidades da pele, e estas foram amostrados por meio de três métodos: *swab*, raspagem, e biópsia. Proteobactéria foi o filo dominante em toda a microbiota da pele, independente da profundidade de amostragem. Foi encontrada forte semelhança na complexidade e na identidade entre a microbiota da pele humana e da pele de rato.

Semelhantes ao intestino, os microorganismos da pele têm papéis essenciais na proteção contra os patógenos invasores, na regulação do sistema imunológico e na degradação dos produtos naturais (SCHARSCHMIDT, FISCHBACH, 2013).

Células do sistema imune inato do hospedeiro são capazes de reconhecer moléculas padrões associadas ao patógeno ou PAMPs (do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*), como alguns componentes da parede celular de bactérias gran negativas (-) e gran positivas (+) (NICOTRA *et al.*, 2012).

No intestino a microbiota comensal reconhece diferentes ligantes bacterianos, que ocorrem por meio dos receptores tipo *Toll-like* (TLRs) e de domínio de oligomerização de nucleotídeos (NODs). O primeiro TRL em mamíferos foi descrito em 1997. Existem 13 tipos descritos e destes 10 TRLs foram identificados em humanos (NICOTRA *et al.*, 2012; SCHWACHA *et al.*, 2012). O acoplamento ligando estes receptores sobre a superfície apical (lúmen exposta) promove tolerância e equilíbrio saudável; no entanto, a ativação destes receptores na superfície basolateral de colonócitos leva a fortes respostas pró-inflamatórias (LAI, *et al.*, 2008).

Células Treg Thymic (Treg) conferem tolerância a antígenos produzidos pelo microbiota residente. A microbiota comensal via TLRs (presentes nas criptas), regula negativamente a sinalização pró-inflamatória por meio da produção de interleucina 10 (IL-10) e de fator de crescimento TGF- $\beta$  no intestino (HOLMES E. e tal., 2015).

Na pele acontecem processos semelhantes. A epiderme contém uma camada basal de queratinócitos em constante proliferação. Os queratinócitos representam a primeira linha de defesa contra patógenos na pele. Expressam receptores de interleucina cutânea amplificando a resposta imune (KIM, KRUEGER 2015).

Na epiderme encontram-se as células apresentadoras de antígenos, ou

células de Langerhans (LCs) que migram para os linfonodos regionais quando ativadas por patógenos externos caracterizando a sua importância imunológica (KIM & KRUEGER 2015). A derme contém as células dendríticas (DCs) e estas fazem a intercessão com fibras de colágeno e fibras elásticas. É através desta via que as células residentes (LCs e DCs) e o sistema imune inato e/ou adaptativo detectam a presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). A ligação de PAMPs a PRRs desencadeia respostas imunes inatas, resultando na secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) que rapidamente matam e/ou inativam uma gama diversificada de micro-organismos, incluindo fungos, bactérias e parasitas (GRICE E. e tal., 2011). Como primeira linha de defesa contra patógenos, alguns peptídeos antimicrobianos (AMPs) são constitutivamente expressos, enquanto a expressão de outros pode ser transitória e controlada por membros da microbiota da pele (NAIK, et al., 2015). Os principais micróbios comensais que habitam a pele são *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) (CHRISTENSEN, BRÜGGEMANN, 2014).

## 2.7 PROBIÓTICOS E OUTROS EFEITOS NA PELE (ESTUDOS EXPERIMENTAIS VIA TÓPICA E ORAL)

Além do efeito na cicatrização cutânea, que será discutido separadamente a seguir, estudos usando probióticos, via oral ou tópica, apresentaram resultados favoráveis na melhora cutânea. Como por exemplo o trabalho de HYUN *et al.* (2014), em modelo de fibroblastos dérmicos humanos e em ratos sem pelos, demonstraram que o uso de *Lactobacillus plantarum* HY7714 inibiu a expressão de metaloproteinase 1 (MMP-1) da matriz, induzida por radiação ultra-violeta (UVB), preservando a expressão de pró-colágeno em fibroblastos humanos. Amostras histológicas de camundongos sem pêlos demonstraram que *L. plantarum* inibiu a expressão das metaloproteinases 13, 2, e 9 (MMP-13, MMP-2 e MMP-9) no tecido dérmico.

Em outro estudo, com melhora na função imune, SUGIMOTO *et al.* (2012), avaliaram o uso oral de *Bifidobacterium breve* estirpe Yakult (BBY) e *Lactobacillus johnsonii* (La1) em ratos sem pelo para proteger dos efeitos deletérios da radiação



UVB na pele. Foi observado aumento nos anticorpos IgA no intestino delgado. As suspensões BBY e o leite fermentado contendo BBY administrados por 9 e 14 dias, respectivamente, suprimiram a produção de elastase e IL-1 beta induzida por (UVB) e impediram a perda de elasticidade associada à exposição à luz ultravioleta.

Resultados semelhantes foram encontrados pelo grupo de GUENICHE et al. (2010) em que demonstraram que o uso de *L. paracasei* CNCM I-2166 diminuiu a inflamação da pele, em modelo *ex vivo*. Alterações como diminuição da vasodilatação, edema, degranulação mastocitária e diminuição de TNF- $\alpha$ , levando a uma reconstrução de barreira mais rápida.

BELKAID, *et al.* (2016), descreveram o papel da microbiota cutânea no processo de diferenciação e queratinização da pele, sua influência na modulação da resposta imune em diferentes desordens estéticas e no controle das alterações dérmicas, principalmente no decorrer do envelhecimento e no processo de cicatrização cutânea.

## 2.8 PROBIÓTICOS E CICATRIZAÇÃO

De acordo com evidências, os probióticos podem ser úteis na prevenção e tratamento de feridas difíceis de cicatrizar, regulando as interações entre o hospedeiro e os microrganismos (WONG *et al.*, 2013).

Após a lesão a recolonização é feita por bactérias das camadas mais profundas da pele e começa em 24 horas após a ruptura da barreira. Durante este processo, a microbiota residente e bactérias do ambiente levam a pele a expressar AMPs e moléculas inflamatórias que se ligam a receptores do tipo TLRs (SCALES, *et al.*, 2013; GRICE, *et al.*, 2012; LAI, *et al.*, 2010). Um defeito na migração dos queratinócitos ou um aumento da proliferação destas células, é uma característica de úlceras crônicas da pele humana (GARDNER *et al.*, 2013).

A inter-relação entre a microbiota cutânea e o sistema imune do hospedeiro é determinante para a cicatrização de feridas (GRICE, *et al.*, 2012, 2015). O controle da inflamação, através da ação dos TLRs e a sinalização nas células cutâneas, pode resultar em novas estratégias de tratamento para desordens inflamatórias e cicatrização da pele (WANG *et al.*, 2011).

TRL4 é um importante regulador da inflamação na ferida. É mais expresso nas fases iniciais da cicatrização e em animais deficientes em TLR4 o fechamento da ferida foi mais lento (CHENG *et al.*, 2013). A ativação de TRL4 e TRL2 na pele, pelos produtos microbianos comensais impede a inflamação excessiva. Ainda a ativação de TRL3 na pele induz inflamação e aumenta a expressão de genes envolvidos na reparação da barreira da pele (BORKOWSKI, GALLO, 2014). *Stafilococcus epidermidis* desempenha papel fundamental na supressão da inflamação da pele, durante o reparo da ferida (LAI, COGEN, RADEK, *et al.* 2010). Estudos mostram que o *S. epidermidis* produz AMPs que modulam as respostas inflamatórias em queratinócitos, por meio da ligação com TLR2 e TLR3 e da modulação de moléculas sinalizadoras como TNF-alfa (GRICE, *et al.* 2012; HOLMES, *et al.*, 2015).

Outros estudos com cepas diversas, relacionando estas com a pele, resposta imune e cicatrização estão surgindo, ressaltando a importância dos probióticos na cicatrização cutânea (HOLMES, *et al.*, 2015).

## 2.9 PROBIÓTICOS E CICATRIZAÇÃO (ESTUDOS EXPERIMENTAIS USO TÓPICO E ORAL)

Muitos probióticos vêm sendo estudados por suas propriedades anti-inflamatórias e imuno moduladoras na pele, seja pelo efeito tópico ou sistêmico. Estes podem agir por diferentes mecanismos conforme resultados que serão discutidos a seguir.

Como por exemplo no seguinte estudo com a aplicação tópica de kefir (contendo uma mistura de LAB e leveduras) resultou na melhora da cicatrização com efeitos antibacterianos e antifúngicos. Os autores usaram um gel de kefir a 70%, em feridas cutâneas de ratos, infectadas com *Staphylococcus aureus*. Após 7 dias de uso tópico as feridas tratadas com gel de kefir eram menores ( $P < 0,001$ ) que as feridas tratadas com emulsão de clostebol-neomicina (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Outro exemplo, com *Lactobacillus plantarum* usado topicamente em queimaduras de pele infectadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Stafilococcus aureus* e *Stafilococcus epidermidis*, cujo efeito anti-inflamatório foi melhor quando comparado ao controle que usou sulfadiazina de prata. Os autores avaliaram a capacidade do

probiótico *Lactobacillus plantarum* em inibir a atividade patogênica de *Pseudomonas aeruginosa*, em queimaduras de pele de rato, *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, *L. plantarum* produziu moléculas sinalizadoras de detecção de *quórum sense* de *P. aeruginosa* durante a formação de biofilme. *In vivo*, *L. plantarum*, foi aplicado topicamente nos dias 3, 4, 5, 7 após a infecção. Amostras de pele, fígado e baço colhidas após 5, 10 e 15 dias e demonstraram inibição da colonização por *P. aeruginosa* por *L. plantarum*. Houve também melhora no reparo tecidual, aumento da fagocitose de *P. aeruginosa* por fagócitos teciduais e diminuição da apoptose em 10 dias (VALDÉZ *et al.*, 2005)

Ainda na melhora da inflamação, outro estudo em ratos com o uso da cepa *Lactobacillus paracasei* NCC2461 demonstrou inibir a inflamação neutrogênica. A adição de *Lactobacillus paracasei* NCC2461 à cultura de linfócitos demonstrou inibir fortemente a atividade proliferativa das células T CD4+. O resultado foi dose-dependente e induziu as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-beta. Os ratos que consumiram o probiótico por 7 dias apresentaram aumento de anticorpos e uma resposta imune mediada por células T *in vivo*, indicando que *L. paracasei* NCC2461 afeta a função das células B e T (BENYACOUUB *et al.* 2014).

Da mesma forma, camundongos tratados com *Lactobacillus casei* tiveram uma capacidade aumentada de produzir IL-10 e promover aumento de células T reguladoras (TREGs) (HACINI-RACHINEL *et al.*, 2009; PELLATON *et al.*, 2012). O estudo com *Bifidobacterium coagulans* também demonstrou efeitos imunorreguladores na pele. A incubação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e polimorfonucleares (PMN) com os fragmentos de sobrenadante e parede celular de *B. coagulans* promoveu fenótipos maduros de células apresentadoras de antígenos e inibiu a formação radicais livres (ROS) induzidas por estresse, *in vitro*. ( BENSON *et al.*, 2012; JENSEN *et al.*, 2010).

Na melhora da contração de ferida, achamos resultados similares no estudo de GUDADAPPANAVAR AM *et al.* (2017), que usaram 2 cepas de *lactobacillus* (*acidófilus* e *plantarum*) em modelos experimentais de ferida. Os probióticos foram administrados por via oral na dose ( $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias [UFC]/g e administrados uma vez a cada 24 h por 10 dias. Os resultados indicam que *L. acidophilus* melhorou significativamente a taxa de contração da ferida ( $P < 0,05$ ), acelerou o depósito de fibrina e apresentou ordenada hemostasia na cascata

inflamatória, caracterizada por neutrófilos, macrófagos e linfócitos dentro do tecido (relatos histopatológicos) que são seguidos de proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno; finalmente, remodelação por reticulação de colágeno e maturação da cicatriz. O resultado encontrado foi a melhora da cicatrização de feridas o que confirma a relação entre o eixo cérebro-pele-intestino.

ZHAO *et al.*, 2018, concluíram que melhorar a microbiota intestinal (MI) ativando a produção de AMPs parece ser o caminho para aumentar a produção de defensinas na pele, o que resulta em melhor controle da inflamação e cicatrização da mesma (ZHAO Y *et al.*, 2018).

Em outro estudo com ratos também foram encontrados resultados similares com a ingestão dietética de bactéria ácido láctica (LBA). Verificou-se menor resposta inflamatória do hospedeiro, e uma progressão mais rápida dos eventos inflamatórios (cascata clássica) durante a cicatrização de feridas. Além disso, a ingestão de LBA levou à rápida deposição de colágeno, o que é muito importante para o reparo adequado da ferida (POUTAHIDIS *et al.*, 2013).

Probióticos podem oferecer uma opção terapêutica potencial modificando a saúde sistêmica e melhorando distúrbios cutâneos e de cicatrização de feridas. Como por exemplo, *L. reuteri* que é capaz de produzir ocitocina e esta agir no eixo intestino-cérebro-pele. Células produtoras de ocitocina foram aumentadas no hipotálamo de camundongos após consumo oral de lisado de *L. reuteri*. Os receptores da ocitocina presentes nos fibroblastos e nos queratinócitos influenciaram na cicatrização. Sabe-se também que a ocitocina fortalece a imunidade do hospedeiro e aumenta a expressão de CD25 e IFN- $\gamma$  em linfócitos tímicos e periféricos, resultando na melhora da imunidade e da cicatrização cutânea (VARIAN, 2017)

O estudo com metabólito bacteriano de *Lactobacillus plantarum* USM8613, em cicatrização de feridas, mostrou que foi capaz de induzir a produção de diferentes defensinas capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Utilizando modelo em ratos, os autores mostraram que a fração rica em proteína de *L. plantarum* USM8613 exerceu propriedades cicatrizantes de feridas por meio da inibição direta de *S. aureus* e promoveu imunidade inata, na qual a expressão de  $\beta$ -defensina foi significativamente regulada ( $p < 0,05$ , aumento de 3,8 vezes). A fração protéica de *L. plantarum* USM8613 também aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a

produção de citocinas e quimiocinas através de vários estágios de recuperação da ferida. A fração rica em proteína de *L. plantarum* USM8613 exerceu atividade inibitória de *S. aureus*. O estudo demonstra o potencial de *L. plantarum* USM8613 em auxiliar a cicatrização de feridas, suprimir a infecção por *S. aureus* nos locais da ferida e promover a imunidade inata do hospedeiro (JIA SIN ONG, 2019).

A microbiota comensal influencia no reparo tecidual de feridas. Usando um modelo de ferida excisional, em camundongos Swiss germe free (GF), os autores observaram que a taxa de fechamento da ferida foi acelerada na ausência de microbiota comensal. A epitelização da ferida avaliada histologicamente foi acelerada no GF em comparação com camundongos convencionais (CV). As feridas dos camundongos GF apresentaram uma diminuição significativa no acúmulo de neutrófilos e um aumento na infiltração de mastócitos e macrófagos nas feridas. Além disso, os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, o fator de crescimento angiogênico VEGF e a angiogênese foram menores no tecido da ferida desses camundongos. Por outro lado, os níveis do fator profibrogênico *TGF-beta1* foram bastante reduzidos em camundongos GF, quando comparados a camundongos CV e as cicatrizes se apresentaram mal formadas, o que demonstra que a microbiota tem papel fundamental nas diferentes etapas da cicatrização. (CANESSO *et al.*, 2014).

A microbiota comensal pode inibir indiretamente o crescimento de cepas patogênicas, durante o processo de cicatrização. Como demonstrado no estudo em feridas dorsais de camundongos, em que foi avaliado a ação tópica do *P. acnes* e a sua capacidade de fermentação. Os resultados mostraram que o *P. acnes* pode fermentar o glicerol um metabólito endógeno da pele em ácido propiônico, um tipo de SCFAs (ácido graxo de cadeia curta). Os SCFAs na pele desempenham um papel fundamental na manutenção da microbiota cutânea. O ácido propiônico inibiu as várias cepas patogênicas, entre elas de *Stafilococcus aureus*, melhorando a cicatrização cutânea (SHU, *et al.*, 2013).

As funções das células epiteliais e dos fibroblastos são rigorosamente reguladas por quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento tanto no intestino como na pele. Probióticos melhoraram estas funções durante o processo de cicatrização da ferida através do aumento da resposta imune, da fortificação da barreira cutânea e da síntese de colágeno. (ALAM, *et al.* (2014); NASRABADI, *et al.*

(2011); IM, KIM, HYUN, CHAE (2016)).

Apesar da intensa pesquisa no campo de cicatrização, ainda precisamos entender completamente os mecanismos que promovem esse processo. Tendo em vista os desafios associados ao tratamento de feridas crônicas, fica claro que novas estratégias são necessárias, entre elas o uso de probióticos. Com base nos efeitos terapêuticos acima mencionados dos probióticos no processo de cicatrização, por aplicação tópica ou por via oral, seu uso potencial no tratamento de feridas e úlceras deve ser levado em consideração.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL, ASPECTOS BIOÉTICOS

Este estudo fez parte da linha de pesquisa em Cicatrização de Tecidos, do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

As experiências com animais foram realizadas nos termos institucionais de acordo com as normas previstas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) após aprovação da Comissão de Ética do uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo (anexo 1, Parecer sob número 294).

Foram utilizados 72 animais adultos, machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia Mammalia*), no total do experimento, com 60 dias de vida e peso de  $250 \pm 26,7$  gramas (g), selecionados aleatoriamente, procedentes do biotério da Universidade Positivo (UP). Os mesmos foram mantidos sob condições específicas ao seu habitat, em respeito a todas as normas técnicas e éticas durante todo o período do experimento, explicadas a seguir.

Durante todo o período experimental os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno apropriadas, com cama de cepilho, recebendo água e ração Presence®-Purina (anexo 3, descrição da composição) *ad libitum*. Foram acondicionados 2 animais por caixa. A sala climatizada foi regulada a uma temperatura de 21°C, com umidade controlada e expostas à luminosidade de 12 horas de luz por dia (ciclo normal) controlada automaticamente no biotério da Universidade Positivo (UP).

#### 3.2 DIETAS ESCOLHIDAS

a) Dieta padrão do biotério: ração Presence® (anexo 3)

b) Água *ad libitum*

c) Probiótico: Probiatop® composto com cepas (doses  $1 \times 10^9$  UFC/g) *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM®, na dose diária de 250 mg/dia/rato o que corresponde a dose aproximada de 200.000 a 210.000 UFC



(unidades formadoras de colônias), administrado via oral, 1 vez ao dia com auxílio de uma espátula (adicionado a requeijão cremoso (1gr) começando 5 dias antes da cirurgia até o dia da eutanásia.

d) Controle: foi utilizado maltodextrina na dose diária de 250 mg/dia/rato (placebo) administrados conforme descrito acima.

### 3.3 GRUPOS DE PESQUISA

Após período de aclimação de 5 dias, os animais foram pesados e divididos de forma randomizada em 2 grupos: controle (suplementados com maltodextrina 250 mg/dia) e probiótico (suplementados com probiótico, 250 mg/dia) após cada grupo foi subdividido em 3 grupos de acordo com o dia da eutanásia: 3PO, 7PO e 10PO, com 12 animais cada, conforme figura 1.

Grupo 1 - Ratos controle com suplementação perioperatória de maltodextrina avaliados no dia 3 de pós-operatório (C3).

Grupo 2 - Ratos com suplementação perioperatória de probiótico Probiatop® avaliados no dia 3 de pós-operatório (P3).

Grupo 3 - Ratos controle com suplementação perioperatória de maltodextrina avaliados no dia 7 de pós-operatório (C7).

Grupo 4 - Ratos com suplementação perioperatória de probiótico Probiatop® avaliados no dia 7 de pós-operatório (P7).

Grupo 5 - Ratos controle com suplementação perioperatória de maltodextrina avaliados no dia 10 de pós-operatório (C10).

Grupo 6 - Ratos com suplementação perioperatória de probiótico Probiatop® avaliados no dia 10 de pós-operatório (P10).

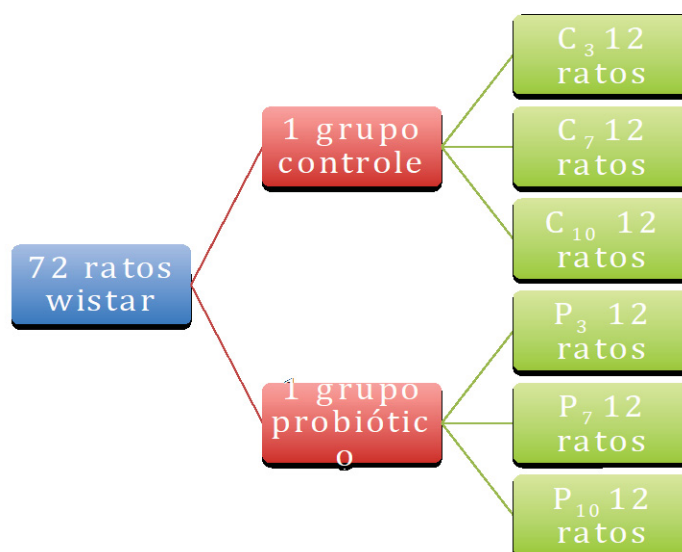


Figura 1 - Esquema da distribuição dos grupos

### 3.3.1 Morbidade e Mortalidade

Após a morte dos animais, foi realizada cuidadosa inspeção de possíveis complicações pós-operatórias não identificadas anteriormente.

### 3.3.2 Controle do Peso

Os ratos foram pesados, no dia do início da suplementação com o probiótico (5 dias antes da cirurgia), no dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório, a fim de verificar se o uso do probiótico alterou o peso dos animais. Foi utilizado balança eletrônica (AM 5500® Marte, São Paulo, SP) para a aferição e a unidade utilizada será o grama (g).

### 3.3.3 Administração do Probiótico ou Placebo

A suplementação do probiótico e do placebo foi feita via oral, com auxílio de uma espátula. A espátula foi colocada diretamente na boca do animal, contendo a dose apropriada do probiótico ou do controle maltodextrina (conforme figura 2). Todas as doses, placebo e probiótico, foram administradas no mesmo horário todos os dias do experimento.



Figura 2 - Exemplo do método utilizado para administração oral do probiótico.

### 3.3.4 Anestesia

Para a realização da cirurgia os ratos foram anestesiados com indução anestésica por via inalatória, pesados e isolados em campânula de vidro, onde receberam oxigênio associado a anestésico inalatório (Isoflurano) e depois mantidos em decúbito dorsal, com associação de cloridrato de quetamina 80mg/kg e cloridrato de xilasina 10mg/kg por via intramuscular. Os ratos foram mantidos sob efeito inalatório do anestésico durante todo o procedimento. Conforme as normas e diretrizes éticas para pesquisa com animais Resolução 879, de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

### 3.3.5 Procedimento Cirúrgico

A equipe cirúrgica foi composta por um cirurgião veterinário e 03 auxiliares (autora, auxiliar e assistente veterinário).

O rato anestesiado foi colocado à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com os quatro membros em extensão para expor o campo operatório. Em seguida, foi realizada tricotomia da região dorsal média e antissepsia com álcool a 70% e PVPI que foram aplicados com algodão topicamente. Em seguida foi realizada ferida quadrada, padronizada por molde medindo 2,0 x 2,0 cm, utilizando bisturi e com a espessura total da pele. As feridas foram deixadas abertas para cicatrizar por segunda intenção (conforme figura 3).

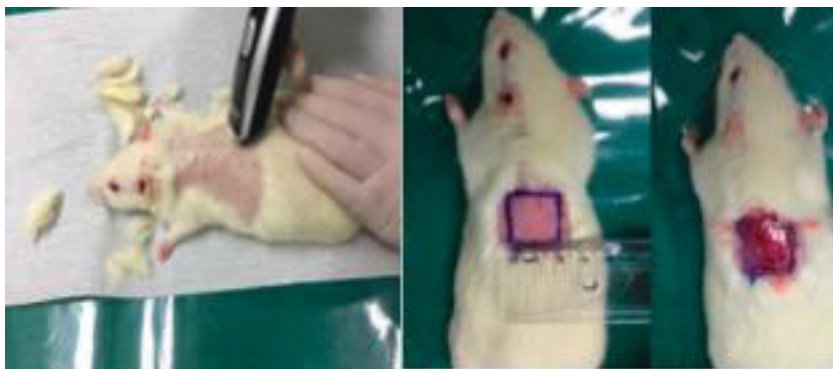


Figura 3 - Exemplo de tricotomia da região dorsal do animal e marcação com molde quadrado de 2,0cm x 2,0cm.

Ao final do procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos em temperatura ambiente até completa recuperação. Ao término do ato operatório cada rato foi colocado em gaiola isolada até completa recuperação anestésica. Após a recuperação anestésica, os ratos foram recolocados em sua gaiola de origem, onde voltaram a receber água e ração *ad libitum*. A analgesia foi realizada com uso de acetaminofeno líquido em dose diária de 200mg/kg/dia por via oral, até o 4º dia de pós-operatório.

### 3.3.6 Análise Macroscópica

As feridas foram macroscopicamente avaliadas por fotografias digitais padronizadas realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 PO para posterior análise das taxas de contração da ferida com *software* específico. As feridas foram fotografadas a uma distância padronizada, apoiando-se a câmera fotográfica sobre uma régua de 15 cm. A análise e o cálculo das áreas, em milímetros quadrados, foram realizados pelo programa Image-Pro® Plus (versão 4.5. Media Cybernetics, Rockville, Maryland, Estados Unidos), conforme demonstrado na figura 6.

### 3.3.7 Eutanásia

No 3º (C<sub>3</sub> e P<sub>3</sub>), 7º (C<sub>7</sub> e P<sub>7</sub>) e 10º (C<sub>10</sub> e P<sub>10</sub>) dia pós-operatório (este período foi escolhido a fim de caracterizar a fase aguda da cicatrização) os ratos foram submetidos à eutanásia em sistema fechado de campânula de vidro, com isoflurano. Imediatamente após a constatação do óbito, cada rato foi submetido a

retirada dos tecidos. As lesões foram excisadas com margem de 1 cm de pele íntegra e incluíram toda a extensão da ferida e armazenadas em frascos, com formol a 10%, a fim de preservar suas estruturas morfológicas para posterior estudo histológico com HE, imunohistoquímico e densitometria do colágeno. As peças foram fixadas em papel cartão e grampeadas para garantir que as fibras não se contraíssem e pudessem comprometer o material. Esses frascos foram identificados com um número (o mesmo dado ao animal), tipo de tratamento, data da cirurgia e data da coleta da peça.

Todos os materiais do estudo foram analisados no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), com auxílio da Dra Lúcia de Noronha.

### 3.3.8 Análise Histológica

As peças foram cortadas em blocos em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura. Para cada ferida, foi confeccionada uma lâmina histológica com 3 a 6 cortes. Os cortes foram executados em plano perpendicular à superfície da derme, na região central e nas bordas da ferida cirúrgica, submetidas aos processos de desidratação e diafanização em xilol, e coradas com hematoxilina e eosina (HE). A leitura das lâminas, foi realizada em microscópio óptico Olympus BX40 (Tóquio, Japão), com ampliações de 20x. Na leitura, foram avaliados tipos e quantidade das células predominantes na reação inflamatória (neutrófilos), presença de edema intersticial e congestão vascular e o grau de formação de tecido de fibrose, neovasos e macrófagos. Os dados foram classificados em acentuado (3), moderado (2) e discreto (1), de acordo com a intensidade em que foram encontrados, e transformados em variáveis quantitativas por meio da atribuição de índice aos achados histológicos. A presença de edema, congestão e polimorfonucleares foram indicativos de processo inflamatório agudo, pontuando negativamente, e a formação de fibrose, neovasos e monócitos foram achados indicativos de processo inflamatório crônico, pontuando positivamente (ver tabela abaixo). Após a atribuição dos índices, estes foram somados para totalizar escore final para posterior avaliação estatística entre os grupos estudados (VIZZOTO JUNIOR AO e tal, 2003).

Tabela 1: Descrição das variáveis avaliadas na leitura histológica (VIZZOTO JUNIOR AO e tal, 2003).

		Classificação do grau de formação		
	Parâmetros	Intensidade		
	Avaliados	Acentuado	Moderado	Discreto
<b>Pontuam negativamente</b>	Polimorfonucleares	-3	-2	-1
	Edema	-3	-2	-1
	Congestão	-3	-2	-1
<b>Pontuam positivamente</b>	Fibroblastos	3	2	1
	Neovasos	3	2	1
	Monócitos	3	2	1

**Itens somados para totalizar escore final**

A leitura das lâminas foi realizada pela autora do trabalho em dois momentos diferentes, após treinamento com patologista e posterior confirmação dos resultados com mais dois patologistas experientes. A figura 4 refere-se a exemplos do estudo histológico, comparando grupo Probiótico com grupo controle, nos dias 3º PO, 7º PO e 10º PO de pós-operatório

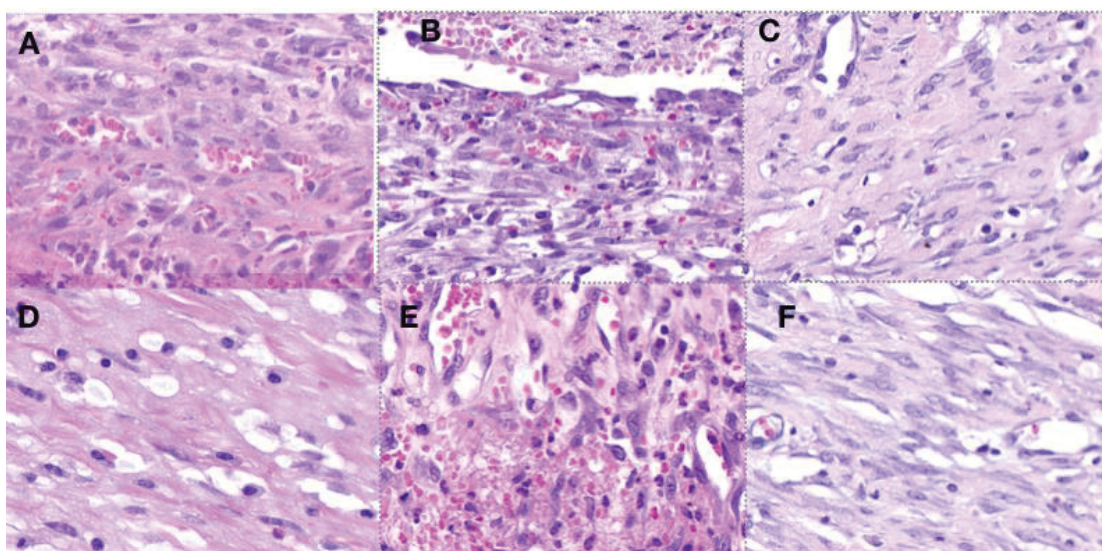


Figura 4 - Exemplo de HE do grupo Probiótico (letras A, B e C) e do grupo Controle (letras D, E, e F) 3º PO, 7º PO e 10º PO de pós-operatório, respectivamente. Observa-se a presença de monócitos, neovasos, fibrose e polimorfos nucleares. Aumento 20x.



### 3.3.9 Densitometria do Colágeno

As lâminas foram coradas com *Picrosirius-red F3BA* (PSR) e fotografadas sendo que cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada. Foram selecionados para leitura 4 campos por ferida, de forma padronizada, sempre de cima para baixo. Foi realizada transmissão da imagem do microscópio ScopeA1® (Zeiss, Alemanha) conectado a câmera digital AxioCam MRc (Zeiss, Alemanha) para um monitor colorido HP ZR2440W. As imagens foram registradas pelos Software AxioVision 4.9 (Zeiss, Alemanha) *Image Pro-plus* e analisadas pelo software Image-Pro Plus® 4.5; (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, Estados Unidos). No sistema RGB (*Red, Green, Blue*) as fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em vermelho-alaranjado (colágeno tipo I, maduro), e as fibras mais finas, dispersas, fracamente birrefringentes, coram-se de tons verdes (colágeno tipo III, imaturo).

Por meio desse sistema, foi possível a quantificação da área ocupada por cada tipo de colágeno em cada campo pré-determinado de corte histológico (JUNQUEIRA; CORSSEMELLI; BRENTANI, 1978) conforme figura 5.

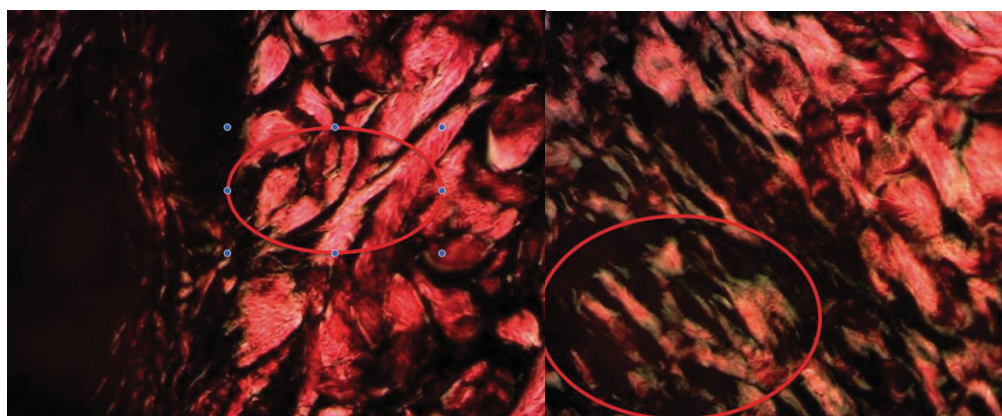


Figura 5 - Exemplos de lâminas coradas em vermelho-alaranjado (colágeno tipo I, maduro), e as fibras mais finas, dispersas, fracamente birrefringentes, coram-se de tons verdes (colágeno tipo III, imaturo), respectivamente. Aumento 20x.

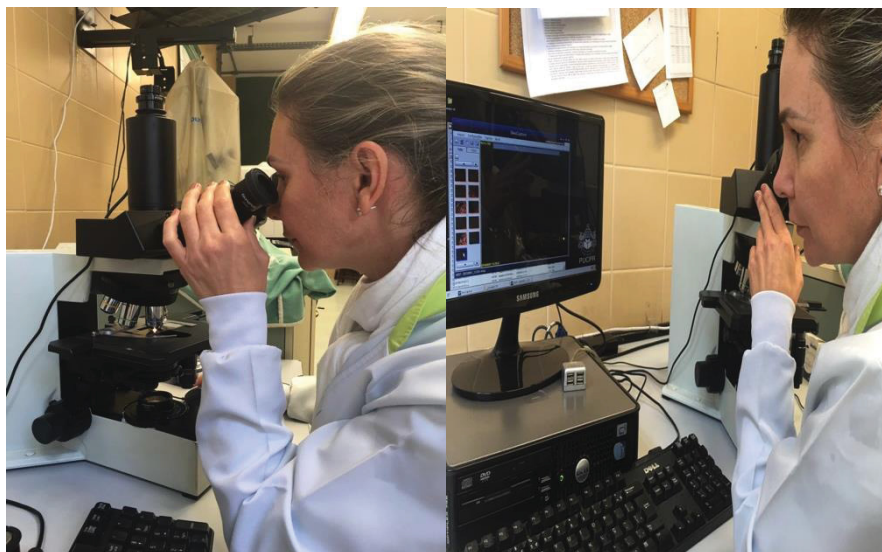


Figura 6: Exemplo de leitura da Densitometria do colágeno técnica de *Picrosirius-red F3BA* (PSR). E também a análise e o cálculo das áreas, em milímetros quadrados, foram realizados pelo programa Image-Pro® Plus (versão 4.5. Media Cybernetics, Rockville, Maryland, Estados Unidos)

### 3.3.10 Estudo Imunohistoquímico

A imunohistoquímica é o método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tecidual ou celular, mediante a utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular (TORRES *et al.*, 1998, WERNER, 2002)

As lesões excisadas foram emblocadas paralelamente em parafina para posterior construção de blocos de *Tissue Microarray*, para otimizar análise imunoistoquímica ( conforme figura 7).





Figura 7 - Exemplo de blocos de *Tissue Microarray*, seleção das áreas escolhidas e coleta do material.

Nas reações imunohistoquímicas, o anticorpo primário liga-se ao antígeno específico, que neste trabalho foram os seguintes: **TNF- $\alpha$**  (Fator de Necrose Tumoral Alfa (TA20); monoclonal mouse, Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz Califórnia USA, WB, diluição 1:50); **IL-6** (Interleucina-6, monoclonal mouse, Abcan®, Cambridge MA, USA; clone ab9234, diluição 1:400); **IL-17**(Interleucina 17; Policlonal mouse, dog e human; Abcan®, Cambridge MA, USA, clone ab79056; diluição 1:200) e **TGF- $\beta$**  (Fator de Transformação Beta1, Policlonal coelho, Spring Bioscience, Pleasnton, Californnia, USA; N/A, diluição 1:100). O antígeno, é reconhecido por um anticorpo secundário, ao qual também se liga um complexo enzimático (streptavina-biotina-peroxidase). Nas reações positivas, a peroxidase transforma a substância cromogênica, em coloração específica castanho na matriz, a qual é reconhecida como positivo, dentro daquela área e quantificada pelo sistema. Sendo esta coloração específica para cada um destes marcadores e determinada por seus fabricantes específicos. A técnica imunohistoquímica utilizada incluiu desparafinização em xilol morno (37°C) e uso de álcool metílico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o primeiro bloqueio endógeno da peroxidase, seguido de água destilada e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para

o segundo. A recuperação antigênica foi realizada com solução de desmascaramento de antígeno BioSB® com citrato em banho-maria a 99°C por 20 minutos. Primeiro os anticorpos foram incubados durante a noite nas diluições recomendadas. EnVision® + Dual Link / Peroxidase, um polímero de dextrana da Dakocytomation®, foi usado por 30 minutos, como anticorpo secundário. A coloração foi desenvolvida adicionando cromogénio e substrato DAB às lâminas, que foram contra-coradas com a hematoxilina de Harris. Controles positivos e negativos foram utilizados para todas as reações. As lâminas imunomarcadas foram digitalizadas pelo Scanner Axio Scan.Z1. (Zeiss, Alemanha). Cada amostra digitalizada foi selecionada individualmente e convertida em imagens de médio aumento (20x), excluindo as fotos seguindo o critério de preenchimento, dobra, rasgo, tecidos que não incluíam o interesse do estudo. A fotomicrografia HPF de controle positivo foi escolhida como a “máscara”, que continha níveis adequados de sinal positivo de imunossupressão tecidual. Em seguida, a máscara foi sobreposta às fotomicrografias das amostras. Baseado no sinal de imuno-expressão tecidual positivo ideal obtido da máscara, o software de análise de imagem Image Pro Plus™ identificou as áreas positivas nas amostras e foi capaz de transformar esses resultados em área de imuno-expressão tecidual positiva por micrômetro quadrado ( $\mu\text{m}^2$ ). A área em  $\mu\text{m}^2$  obtida com este método foi dividida pela constante de 90.604,96  $\mu\text{m}^2$ , que é a área total do HPF observada, gerando assim um valor percentual para a área de imuno-expressão tecidual positiva para cada HPF. Para cada caso, uma porcentagem média de área positiva foi determinada em 10 campos de médio aumento. Usou-se aumento de 20x (conforme figura 8).

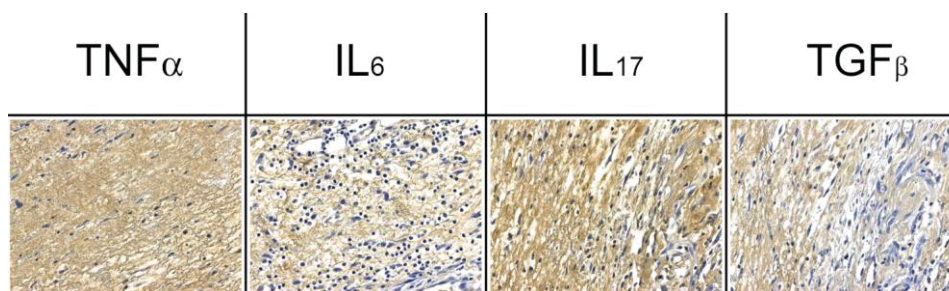


Figura 8 - Exemplos de imagens das citocinas IL6, IL17, TNF- $\alpha$  e do Fator de Crescimento TGF- $\beta$ .. Fotomicrografias com aumento de 20x,

### 3.3.11 Análise Estatística

Os resultados foram descritos por médias e desvios padrões, medianas, valores mínimos, valores máximos. Para a comparação dos grupos controle) e probiótico), em cada dia de avaliação, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

As comparações entre os dias de avaliação, dentro dos grupos controle e probiótico, foram feitas usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics®, v.20.

#### 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

A partir dos dados deste estudo, foram gerados dois artigos principais, que seguem na sequência abaixo citada:

- A) Efeito da Administração Oral de Probióticos na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos. TAGLIARI e tal.(2019). Artigo publicado na revista ABCD (Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, SP, 2019, DOI:/ 15.1590/0102-67202019001e1457).
- B) Effects of oral probiotics administration in the expression of TGF<sub>beta</sub>, and the pro-inflammatory cytokines Interleukins 6, Interleukins 17, and TNF<sub>alfa</sub> in skin wounds in rats

## 4.1 ARTIGO 1

Artigo Original

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICOS NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
CUTÂNEAS EM RATOS**

*EFFECT OF PROBIOTIC ORAL ADMINISTRATION ON SKIN WOUND  
HEALING IN RATS*

Eliane **TAGLIARI**<sup>1</sup>, Leticia Fuganti **CAMPOS**<sup>1</sup>, Antonio Carlos  
**CAMPOS**<sup>2</sup>, Thaís Andrade **COSTA-CASAGRANDE**<sup>3</sup>, Lúcia de  
**NORONHA**<sup>4</sup>

Trabalho realizado no <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná; <sup>2</sup>Departamento de Cirurgia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná; <sup>3</sup>Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo; <sup>4</sup>Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

**Correspondência:**

Eliane Tagliari

E-mail: elianetagliari@yahoo.com.br

Financiamento: Este estudo foi financiado em parte pelo FQM-FARMA, e em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) - Código Financiamento 001

Conflito de interesse: Nenhum

**RESUMO - Racional:** Manipular a microbiota intestinal parece auxiliar na resposta cutânea. Entender todas as etapas do processo de cicatrização, bem como a resposta intestino-pele-cicatrização, pode ser ferramenta complementar no reparo cutâneo. **Objetivo:** Avaliar o efeito de suplementação perioperatória de probióticos via oral na cicatrização de feridas cutâneas excisionais em ratos. **Métodos:** Setenta e dois ratos adultos, machos Wistar, foram divididos em dois grupos de 36, sendo um de controle (suplementado com maltodextrina 250 mg/dia) e outro probiótico (suplementado com *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus Rhamnosus* HN001, *Lactobacillus Acidophilus* NCFM®, 250 mg/dia). **Resultados:** Não houve modificação significativa de peso em ambos os grupos. A contração da ferida foi mais rápida no grupo probiótico, quando comparada ao controle, resultando em menor área cruenta no sétimo dia do pós-operatório. Quanto aos aspectos histológicos, o escore geral do HE foi menor no grupo probiótico. O grupo probiótico apresentou maior fibrose do terceiro ao sétimo dias pós-operatórios. A produção de colágeno tipo I foi maior no grupo probiótico no décimo dia pós-operatório, e do tipo III maior no sétimo. **Conclusão:** O uso perioperatório do probiótico via oral foi associado à redução mais rápida da área cruenta da ferida cutânea em ratos, possivelmente por reduzir a fase inflamatória, acelerando a fibrose e o processo de deposição de

colágeno.

**DESCRIPTORES:** Cicatrização. Administração oral. Probióticos. Ratos

**ABSTRACT** – *Background:* Manipulating intestinal microbiota with probiotics might stimulate skin response. Understanding all stages of the healing process, as well as the gut-skin-healing response can improve the skin healing process. *Aim:* To evaluate the effect of perioperative oral administration of probiotics on the healing of skin wounds in rats. *Methods:* Seventy-two Wistar male adult rats were weighed and divided into two groups with 36 each, one control group (supplemented with oral maltodextrin 250 mg/day) and one probiotic group (supplemented with *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM® at a dose of 250 mg/day), both given orally daily for 15 days. The two groups were subsequently divided into three subgroups according to the moment of euthanasia: in the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> postoperative days. *Results:* There were no significant changes in weight in both groups. Wound contraction was faster in probiotic group when compared to the controls, resulting in smaller wound area in the 7<sup>th</sup> postoperative day. As for histological aspects, the overall H&E score was lower in the probiotic group. The probiotic group showed increased fibrosis from 3<sup>rd</sup> to the 7<sup>th</sup> postoperative day. The type I collagen production was higher in the probiotic group at the 10<sup>th</sup> postoperative day, and the type III collagen increased in the 7<sup>th</sup>. *Conclusion:* The perioperative use of orally administrated probiotic was



associated with a faster reduction of the wound area in rats probably by reducing the inflammatory phase, accelerating the fibrosis process and the deposition of collagen.

**HEADINGS:** Probiotics. Wound healing. Rats. Administration, oral.

## INTRODUÇÃO

A pele é um ecossistema variado composto por 1,8 m<sup>2</sup> de tecido que recobre todo o corpo, rica em dobras, anexos cutâneos e contém microbiota diversificada<sup>11</sup>. Recentemente, análises moleculares avançadas da microbiota cutânea revelaram grande diversidade e estas variam de acordo com localização topográfica sobre o corpo<sup>7</sup>. A cicatrização é processo celular dinâmico que envolve eventos moleculares e bioquímicos visando a reconstituição tecidual<sup>3,4</sup>. A cicatrização pode ser avaliada com parâmetros clínicos, mecânicos, bioquímicos e histológicos<sup>3,4</sup>. A microbiota da pele também exerce papel fundamental na resposta imune cujas alterações na imunidade inata dela podem interferir na cicatrização de feridas<sup>20</sup>. A percepção da pele como um ecossistema rico em componentes biológicos vivos e presentes em diferentes locais, explica o delicado equilíbrio entre hospedeiro e micro-organismos. A microbiota cutânea sofre influência da microbiota intestinal e esta também tem demonstrado interagir com o hospedeiro de forma simbiótica, modulando a inflamação e o sistema imunológico, agindo na biotransformação de xenobióticos e na absorção de micronutrientes, sintetizando vitaminas, enzimas e



proteínas usadas pelo hospedeiro, fermentando substratos energéticos, fornecendo resistência a patógenos e mudando a quantidade de energia disponível na dieta<sup>26</sup>. A manipulação da cicatrização com o uso de probióticos tem sido estudada tanto para uso tópico quanto sistêmico. Os probióticos são colocados pela Organização Mundial de Saúde como “microrganismos vivos, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro<sup>8,24,26,29</sup>. Probióticos têm sido associados com melhora da cicatrização de úlceras intestinais e cicatrização de feridas cutâneas entre outras ações já descrita na literatura<sup>20</sup>.

O objetivo do estudo foi analisar o efeito da administração oral de probióticos na cicatrização cutânea em ratos mediante aspectos macroscópicos, histológicos e deposição do colágeno da ferida.

## **MÉTODOS**

O estudo fez parte da linha de pesquisa em Cicatrização de Tecidos do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná - UFPR. Os experimentos com animais foram realizadas de acordo com as normas previstas na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, normas previstas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) após aprovação da Comissão de Ética do uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo (Parecer de número 294).

### **Animais e administração do probiótico**

Durante todo o experimento os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno apropriadas, com cama de cepilho, recebendo água e ração Presence®-Purina ad libitum. Foram alojados dois animais por caixa, mantidos em sala climatizada em temperatura de 21° C, com controle de umidade e expostas à luminosidade de 12 h de luz por dia, controlada automaticamente. Foram utilizados 72 ratos adultos, machos Wistar, pesando  $\pm 250$  g, procedentes do biotério da Universidade Positivo. Os ratos foram pesados e divididos em dois grupos com 36 animais cada, sendo um grupo controle (suplementado com maltodextrina 250 mg/dia) e um grupo probiótico (suplementados com probiótico Probiatop® da FQM-FARMA composto com cepas *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM®, na dose de 250 mg/dia, o que corresponde a dose aproximada de 200.000 a 210.000 UFC (unidades formadoras de colônias), administrado via oral, 1 vez ao dia com auxílio de uma espátula<sup>24</sup> misturado com requeijão cremoso. Os dois grupos foi subdivididos em três sub grupos de acordo com o momento da eutanásia em 3<sup>o</sup> pós-operatório (3PO), 7<sup>o</sup> pós-operatório (7PO) e 10<sup>o</sup> pós-operatório (10PO), com 12 ratos cada.

### **Procedimento cirúrgico**

Após cinco dias de administração oral pré-operatória do probiótico ou maltodextrina, os ratos foram anestesiados e submetidos

a uma ferida dorsal excisional quadrada, padronizada por molde medindo 2x2 cm. A anestesia foi via inalatória (isoflurano) e mantidos com associação de cloridrato de ketamina 80 mg/kg e cloridrato de xilasina 10 mg/kg por via intramuscular, sendo mantidos sob o efeito inalatório do anestésico durante todo procedimento. Após recuperação, retornaram às suas gaiolas de origem recebendo água e alimentação ad libitum. Para analgesia foi utilizado acetaminofeno líquido em dose diária de 200 mg/kg/dia por via oral, até o 4º dia de pós-operatório. Foram avaliados nos dias 3PO, 7PO e 10PO (Figura 1).

Início da administração do Probiótico ou Maltodextrina	Procedimento cirúrgico, foto e pesagem	Foto e pesagem	Foto e pesagem	Foto e pesagem
Dia -5	Dia 0	3PO dia	7PO Dia	10PO dia
		Eutanásia e excisão das lesões dos sub-grupos C <sub>3</sub> e P <sub>3</sub>	Eutanásia e excisão das lesões dos sub-grupos C <sub>7</sub> e P <sub>7</sub>	Eutanásia e excisão das lesões dos sub-grupos C <sub>10</sub> e P <sub>10</sub>

**FIGURA 1** - Desenho do estudo

As feridas foram fotografadas a uma distância padronizada, apoiando-se a câmera fotográfica sobre régua de 15 cm. A análise e o cálculo das áreas, em milímetros quadrados, foram realizados pelo programa Image-Pro® Plus (versão 4.5. Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA).

### **Eutanásia e coleta de materiais**

No 3ºPO (C3 e P3), 7ºPO (C7 e P7) e 10ºPO (C10 e P10) dia pós-operatório, os ratos foram submetidos à eutanásia também em

sistema fechado com isoflurano. Imediatamente após morte, as lesões foram excisadas e incluíram toda a extensão da ferida com margem de 1 cm de pele íntegra e armazenadas em frascos, com formol a 10%, a fim de preservar suas estruturas morfológicas para posterior estudo histológico e densitometria do colágeno.

### **Análise histológica**

As peças foram cortadas em blocos em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura. Para cada ferida, foi confeccionada uma lâmina histológica com 3-6 cortes. Os cortes foram executados em plano perpendicular à superfície da derme, na região central e nas bordas da ferida cirúrgica e submetidas aos processos de desidratação e diafanização em xilol, e coradas com H&E. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus BX40 (Tóquio, Japão), com ampliações de 20x. Na leitura, foram avaliados tipos e quantidade das células predominantes na reação inflamatória (neutrófilos), presença de edema intersticial e congestão vascular e o grau de formação de tecido de fibroblastos, neovasos e macrófagos. Os dados foram classificados em acentuado (3), moderado (2) e discreto (1), de acordo com a intensidade em que foram encontrados, e transformados em variáveis quantitativas por meio da atribuição de índice aos achados histológicos. A presença de edema, congestão e polimorfonucleares, foram indicativos de processo inflamatório agudo, pontuando negativamente, e a formação de fibroblastos, neovasos e monócitos foram achados indicativos de processo inflamatório crônico,

pontuando positivamente. Após a atribuição dos índices, eles foram somados para totalizar escore final para posterior avaliação estatística entre os grupos estudados<sup>25</sup>.

### **Densitometria do colágeno**

Lâminas histológicas foram coradas com Picrosirius-red F3BA e fotografadas sendo que cada imagem foi capturada com luz normal e polarizada. Foram selecionados quatro campos por ferida, de forma padronizada, sendo dois da borda e dois da área central da ferida, sempre de cima para baixo. Foi realizada transmissão da imagem do microscópio ScopeA1<sup>®</sup> (Zeiss, Alemanha) conectado à câmera digital AxioCam MRc (Zeiss, Alemanha) para um monitor colorido HP ZR2440W. As imagens foram registradas pelo Software AxioVision 4.9 (Zeiss, Alemanha) Image Pro-plus e analisadas pelo software Image-Pro Plus<sup>®</sup> 4.5; (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, Estados Unidos). No sistema RGB (Red, Green, Blue) as fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em vermelho-alaranjado (colágeno tipo I, maduro), e as fibras mais finas, dispersas, fracamente birrefringentes, coram-se de tons verdes (colágeno tipo III, imaturo).

### **Análise estatística**

Os resultados foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios-padrão. Para a comparação entre os grupos, em cada dia de avaliação, foi usado o teste não-paramétrico

de Mann-Whitney. As comparações entre os dias de avaliação, dentro dos grupos controle e probiótico, foram feitas usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics®, v.20.

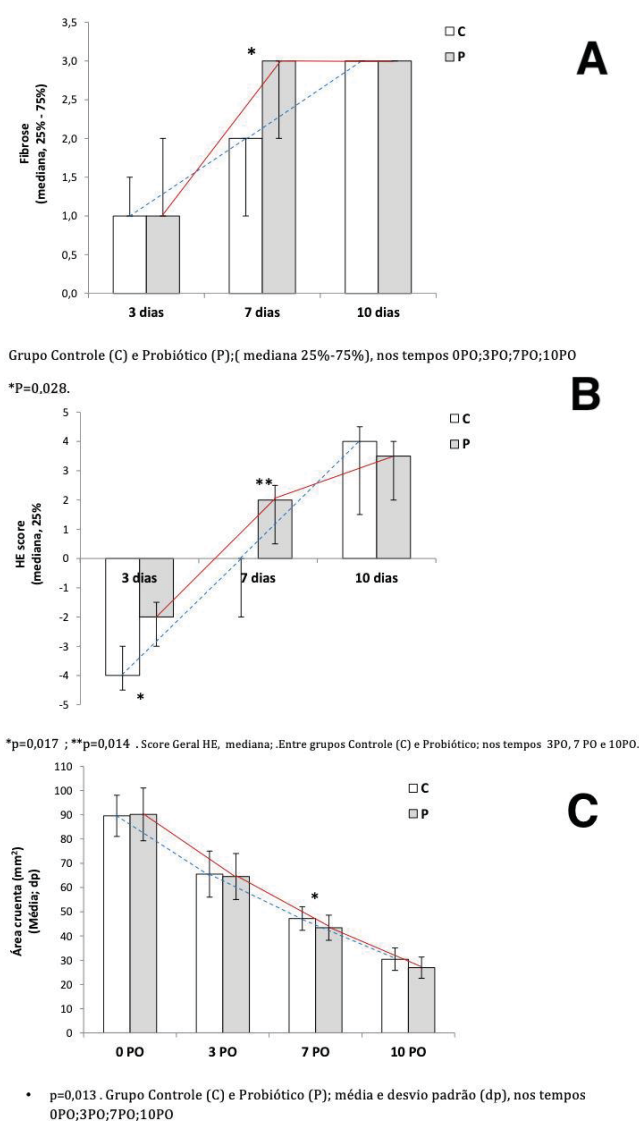
## RESULTADOS

Durante todo o experimento, não houve óbitos. O peso corporal não apresentou alterações significativas em nenhum grupo durante todo o experimento dia -5 (3PO  $p=0.150$ ; 7PO  $p=0.410$ ; 10PO  $p=0.107$ ), dia 0 (3PO  $p=0.867$ ; 7PO  $p=0.851$ ; 10PO  $p=0.185$ ), dia 3PO (3PO  $p=0.741$ ; 7PO  $p=0.599$ ; 10PO  $p=0.629$ ), dia 7PO (7PO  $p=0.730$ ; 10PO  $p=0.549$ ) e dia 10PO (10PO  $p=0.937$ ).

### Análise histológica

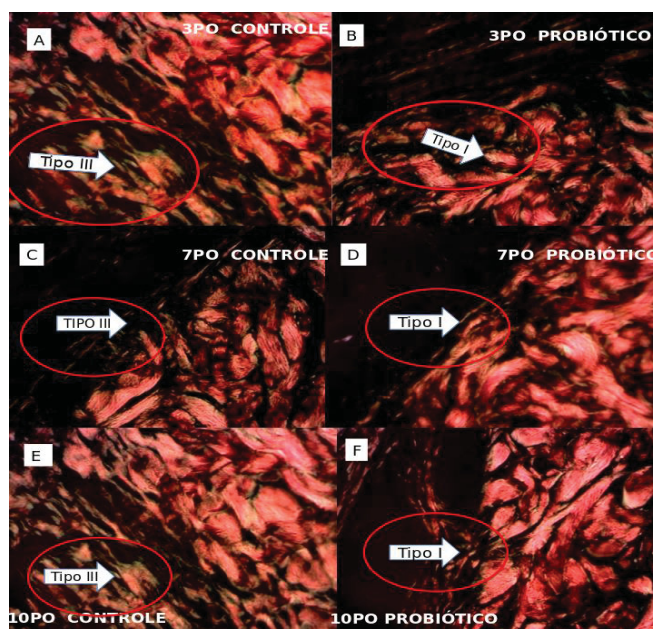
Na Figura 2A são mostrados os resultados para os indicadores histológicos da reação inflamatória. Para as variáveis edema, congestão e polimorfonucleares, não houve diferença quando comparados os grupos controle e probiótico em todos os tempos analisados. A fibrose no 7PO foi significativamente maior no grupo probiótico quando comparado com o controle ( $p=0.028$ ). Para as variáveis neovasos e monócitos, não houve diferença significativa entre os grupos. Ainda na Figura 2B pode-se ver que o score geral do H&E

foi melhor no grupo probiótico quando comparado com o controle no 3PO ( $p=0.017$ ) e no 7PO ( $p=0.014$ ). Figura 3 demonstra exemplos da evolução histológica (edema, congestão, polimorfosnucleares, fibrose, neovasos e monócitos) entre controle e probiótico, nos dias 3PO, 7PO e 10 PO. Observou-se que o grupo probiótico apresentou menos edema, congestão e polimorfosnucleares e a contagem dos monócitos foi equivalente.



Expresso em média + desvio padrão

**FIGURA 2** – Nos tempos 3PO, 7PO e 10PO entre os grupos Controle (C) e Probiótico (P): A) gráfico mostrando a quantidade de fibrose; B) gráfico mostrando evolução histológica celular; C) gráfico mostrando a área do tecido da ferida ( $\text{mm}^2$ ), nos tempos 3PO, 7PO e 10PO



Colágeno tipo I (corado em vermelho) e colágeno tipo III (corado em verde); Picrosirius-Red F3BA (PSR),

20x

**FIGURA3** Evolução histológica (edema, congestão, polimorfonucleares, fibrose, neovascularização e monócitos) entre controle e probiótico: A e B) 3PO A = controle, B = probiótico; C e D) 7PO C = controle; D = probiótico; E e F) 10PO E = controle e F = probiótico

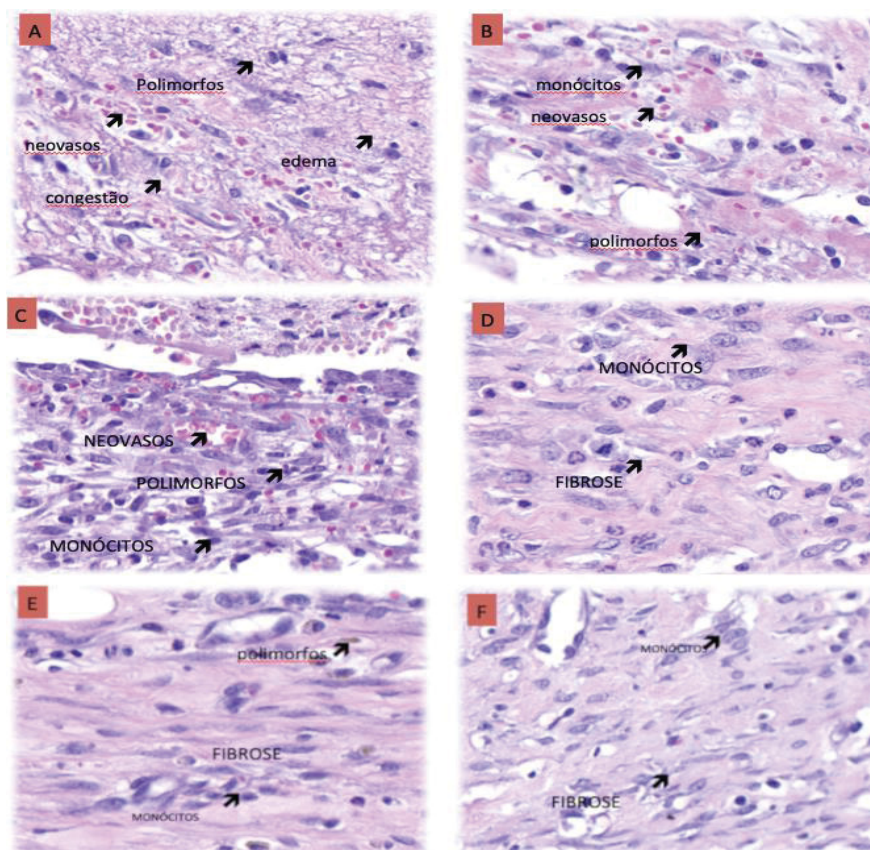
### Análise do Colágeno

Tabela 1 mostra os resultados da avaliação da deposição dos colágenos tipo I e tipo III, na ferida. O tipo I foi maior no grupo probiótico no 10PO ( $p=0.007$ ), quando comparado com o controle. Houve aumento do colágeno tipo III no 7PO ( $p=0.014$ ) no grupo probiótico quando comparado com o grupo controle. Na Figura 4 a distribuição dos colágenos tipo I e tipo III é mostrada nos tempos 3PO, 7PO e 10PO, para os grupos controle e probiótico



**TABELA 1** – Avaliação de colágeno I e colágeno III (na área total), expressos em mm<sup>2</sup>, nos grupos controle e probiótico, nos tempos 3PO, 7PO e 10 PO.

Variável	Grupo	n	Média ± desvio padrão			p* (3 <sup>o</sup> x 7 <sup>o</sup> x 10 <sup>o</sup> )
			Dia 3PO	Dia 7PO	Dia 10PO	
Colágeno I						
Área (mm²)	Controle	12	1.33 ± 0.88	0.96 ± 0.85	0.62 ± 0.61	0.313
	Probiótico	12	1.75 ± 0.66	0.30 ± 0.23	1.38 ± 0.73	<0.001
	p** (C x P)		0.266	0.028	0.007	
Colágeno III						
Área (mm²)	Controle	12	0.019 ± 0.014	0.018 ± 0.010	0.032 ± 0.027	0.598
	Probiótico	12	0.014 ± 0.013	0.029 ± 0.012	0.029 ± 0.028	0.023
	p** (C x P)		0.178	0.014	0.932	



**FIGURA 4** – Exemplo de evolução histológica (edema, congestão, polimorfonucleares, fibrose, neovascularização e monócitos) em ambos os grupos controle e probiótico nos dias 3PO (A e B), 7PO (C e D) e 10PO (E e F)

### Área cruenta da ferida

Conforme descrito na Figura 2C, a contração da ferida foi maior no grupo probiótico no 7PO quando comparado com o controle, resultando em menor área cruenta ( $43,4 \pm 5,2$  vs.  $47,2 \pm 4,9$  mm<sup>2</sup>;  $p=0.013$ ). Como mostrado na Figura 4, a evolução da contração da ferida foi mais rápida no grupo probiótico em comparação aos controle.

## DISCUSSÃO

Probióticos e seus metabólitos são consideradas reguladores de

várias funções biológicas, e seus efeitos estão sendo estudados no eixo intestino-pele, controlando a cicatrização de feridas<sup>7</sup>. Probióticos podem ser usados via tópica ou sistêmica. Muitos estudos relacionam os benefícios dos probióticos topicamente, demonstrando melhora na cicatrização de feridas através da redução da carga bacteriana e aumento da reparação tecidual em modelos de ferida de roedores<sup>16</sup>. Os efeitos sistêmicos dos probióticos promovem a ligação entre a microbiota intestinal e a cutânea, diminuem a inflamação, alteram a composição da microbiota em ambos os locais e regulam o sistema imune inato<sup>28</sup>. Ainda o uso oral melhora a microbiota intestinal e absorção de nutrientes essenciais na cicatrização de feridas, como vitaminas, minerais e cofatores para enzimas chaves na regulação da cicatrização cutânea<sup>16,28</sup>.

Scotti et al<sup>23</sup>. mostrou em sua revisão que as diferenças na composição microbiana do intestino podem afetar a homeostase da extração de energia, o que pode implicar no ganho ou perda de peso no hospedeiro quando suplementado com probiótico. Neste estudo, não houve diferença de peso nos dias avaliados em todos os grupos.

A cicatrização de feridas é processo altamente dinâmico que envolve sequência complexa de eventos celulares e bioquímicos que variam desde uma resposta imediata ao dano celular da pele e sinais microbianos invasivos até respostas inflamatórias, angiogênicas e, finalmente, fibroplasia e formação de cicatriz<sup>3,4,21,28</sup>. Os fenômenos acontecem simultaneamente, se autorregulam e interferem um no outro envolvendo três fases dinâmicas: fase inflamatória, fase proliferativa e

fase de remodelamento<sup>4,5,29</sup>. A interação entre inflamação, respostas celulares e humorais com intensa produção e liberação de citocinas é fundamental para o próprio processo de cicatrização<sup>3,4,21</sup>. O presente estudo descreve um modelo de cicatrização cutânea excisional em ratos, com o objetivo de avaliar o efeito da administração oral de probiótico na cicatrização de feridas cutâneas. Avaliações macroscópicas e microscópicas das feridas cutâneas em ratos foram realizadas em três momentos distintos: 3PO, 7PO e 10PO.

Neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da lesão. A principal função delas é proteger o hospedeiro de infecção combatendo micro-organismos invasores e/ou removendo detritos celulares, bem como a apresentação de antígenos. No entanto, neutrófilos ativados secretam substâncias bioativas, como proteases e radicais livres, que em excesso, podem levar a danos teciduais<sup>5,28</sup>. A seguir os queratinócitos migram para a derme ferida e proliferam formando o tecido de granulação que tem por finalidade restaurar a função de barreira da pele. Fibroblastos invadem o coágulo e ocorre angiogênese seguida da remodelação de tecidos, controlada pelos fibroblastos que produz colágeno e forma a cicatriz<sup>5,17</sup>.

Muitas funções de monócitos e macrófagos foram ligados à ativação de receptores Toll-like (TLRs)<sup>12,13,15,18</sup>. A resposta à lesão da pele em animais é desencadeada por padrões moleculares associados ao dano derivado do hospedeiro e à ativação de células inflamatórias<sup>13</sup>. Os achados do processo inflamatório agudo como edema intersticial e congestão vascular, têm ligação menos estreita com o processo de

proliferação celular, enquanto que o processo inflamatório crônico está histologicamente relacionado ao infiltrado polimorfonucleares, tecido de granulação e fibrose<sup>25</sup>. Fibrose é definida como o depósito de fibra intersticial que marca o início da cicatriz.

A fase proliferativa, marcada pela presença de fibrose foi maior grupo probiótico no dia 7PO, quando comparado com o controle, resultando em menor área cruenta naquele momento. Provavelmente, o uso de probiótico estimulou a deposição de colágeno e facilitou a fibrose, melhorando o processo de cicatrização. A quantidade de colágeno no dia 7PO no grupo probiótico foi equivalente àquela observada nos controles no dia 10PO. Ao analisar o escore geral do H&E, espera-se que na fase inicial (3PO) as pontuações sejam negativas, mas no grupo probiótico estas foram menos negativas. Aos 7 dias (7PO), quando a fase subaguda se inicia, o escore do grupo probiótico já era positivo, mostrando uma resolução mais rápida do processo de cicatrização no grupo probiótico quando comparado ao grupo controle. No 10PO o grupo probiótico mostrou sinais de estabilização da fase de cicatrização crônica e sinais de remodelação da matriz.

A redução da área da ferida foi mais rápida no grupo probiótico. Ao comparar a contração da área da ferida, proliferação de fibroblastos e evolução histológica, fica claro que o grupo suplementado com probiótico teve uma melhor resolução do processo de cicatrização.

O mecanismo possivelmente envolvido neste processo está relacionado com o papel dos receptores Toll-like (TLRs)<sup>12,13,15,18,22</sup>. Os

tecidos epiteliais de revestimento externo e interno expressam TLRs, como a pele e o intestino. A microbiota comensal deles expressa peptídeos antimicrobianos (AMPs)<sup>13,15</sup>. Os AMPs também estimulam e aumentam as vias de TLRs, induzem a produção de quimiocinas com atividade quimiotática e ainda modulam a função de células dendríticas e linfócitos T para promover a cicatrização de feridas e manter a homeostase da barreira da pele<sup>12,13,15,18</sup>. A expressão de TLR em neutrófilos, fibroblastos, monócitos e macrófagos é primordial para a resposta cicatricial<sup>18,22</sup>. O aparecimento de ligantes de TLRs indica alteração na integridade do tecido, o que requer contenção e reparo. Animais deficientes em TLRs apresentaram atraso na cicatrização de feridas, sobretudo no tocante ao processo de neovascularização, re-epitelização e fibrose<sup>18</sup>. O papel dos TLRs na cicatrização cutânea vem sendo fortemente explorado nos estudos científicos sobretudo no tocante à fibrose cicatricial<sup>12,13,15,18,19,22</sup>. Conforme resultados encontrados nos marcadores histológicos aqui avaliados, acredita-se que eles podem estar relacionados com a ação dos probióticos, via TLRs, na cicatrização cutânea em ratos.

Os achados ainda foram confirmados pela análise da deposição do colágeno. O colágeno tipo III é rico em água, pouco polimerizado e tem função de preenchimento. O tipo I é pobre em água e muito polarizado, cuja função é de tração. A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão depositadas<sup>10,22</sup>. No início do processo a cicatrização começa da periferia para o centro, impulsionando a organização das

fibras para remodelar o colágeno. O preenchimento dado pelo colágeno tipo III à área da cicatriz foi maior e ocorreu no 7PO no grupo probiótico, mas não no grupo controle, resultando em maior produção de colágeno tipo I, que foi maior no grupo probiótico no 10PO.

[Poutahidis et al.](#)<sup>19</sup>, avaliaram o uso oral de bebida probiótica (*L. reuteri*) em camundongos, onde o fechamento da ferida marcado pela maturação acelerada do tecido de granulação e a deposição de colágeno, ocorreu a partir do sexto dia de pós-operatório no grupo suplementado com *L. reuteri*, quando comparados com o controle suplementados com água, semelhante aos nossos achados.

Modular a microbiota utilizando probióticos de diferentes espécies envolve diferentes mecanismos incluindo: a) competição com bactérias patogênicas por nutrientes e sítios de ligação na célula hospedeira; b) inativação de toxinas e metabólitos; c) produção de substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de microrganismos patológicos; d) estimulação/modulação da resposta imune do hospedeiro, envolvendo células epiteliais, células dendríticas e linfócitos T reguladores, tanto no trato gastrointestinal como na pele<sup>6,19</sup>.

Estudos avançados feitos com modelos animais e com humanos mostrou os efeitos benéficos entre as bactérias do intestino e a aparência da pele. Um deles realizado por [Levkovich et al.](#)<sup>24</sup> trouxeram resultados positivos com a suplementação de *Lactobacillus reuteri* no aumento da espessura dérmica e da foliculogênese, além de potencializar a produção de sebo e melhorar o brilho da pele<sup>25</sup>.

[Heydari et al.](#)<sup>9</sup> estudaram o efeito de probiótico (*L. plantarum*) em

feridas cutâneas de ratos nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 do pós-operatório, onde os resultados encontrados foram fase aguda mais precoce com menor número total de neutrófilos no 3PO e redução da área da ferida; portanto, esta redução pode acelerar o processo de cicatrização, reduzir a inflamação, e fatores de crescimento liberados ajudaram a ter re-epitelização mais precoce. Estes achados corroboram com os aqui apresentados.

Probióticos ainda participam na melhora do processo de diferenciação e queratinização da pele, na modulação da resposta imune cutânea e no processo de cicatrização cutânea<sup>19</sup>. Probióticos administrados oralmente resultam em aumento de células Treg Foxp3+ nos linfonodos da pele, regulando positivamente a expressão de IL10, diminuindo o dano tecidual na borda da ferida e reduzindo a inflamação em modelo murino<sup>1</sup>.

## **CONCLUSÃO**

O uso perioperatório de probiótico administrado por via oral foi associado com redução mais rápida da área da ferida em ratos, provavelmente pela redução da fase inflamatória, acelerando o processo de fibrose e a deposição de colágeno.

## **REFERÊNCIAS**

1. Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on



cutaneous immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(6):353-366.

2. Borkowski A, Gallo R. UVB Radiation Illuminates the Role of TLR3 in the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(9):2315-2320.
3. Campos A, Borges-Branco A, Groth A. Cicatrização de feridas. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo). 2007;20(1):51-58.
4. Campos A, Groth A, Branco A. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2008;11(3):281-288.
5. Castilho T, Campos A, Mello E. Effect of Omega-3 Fatty Acid in the Healing Process of Colonic Anastomosis in Rats. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo). 2015;28(4):258-261.
6. Chen L, Guo S, Ranzer M, DiPietro L. Toll-Like Receptor 4 Has an Essential Role in Early Skin Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(1):258-267.
7. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman D. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007;449(7164):811-818.
8. Flesch A, Poziomyck A, Damin D. The therapeutic use of symbiotics. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo). 2014;27(3):206-209.
9. Heydari Nasrabadi. Study of cutaneous wound healing in rats treated with *Lactobacillus plantarum* on days 1, 3, 7, 14 and 21. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;5(21).
10. Houdek M, Wyles C, Stalboerger P, Terzic A, Behfar A, Moran S. Collagen and Fractionated Platelet-Rich Plasma Scaffold for Dermal Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016;137(5):1498-1506.
11. Komatsu N, Saijoh K, Sidiropoulos M, Tsai B, Levesque M, Elliott M et al. Quantification of Human Tissue Kallikreins in the Stratum Corneum: Dependence on Age and Gender. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005;125(6):1182-1189.
12. Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Leichtle A, Yang Y, Cogen A et al. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1377-1382.

13. Lai Y, Gallo R. Toll-Like Receptors in Skin Infections and Inflammatory Diseases. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 2008;8(3):144-155.
14. Levkovich T, Poutahidis T, Smillie C, Varian B, Ibrahim Y, Lakritz J et al. Probiotic Bacteria Induce a 'Glow of Health'. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53867.
15. Lin Q, Wang L, Lin Y, Liu X, Ren X, Wen S et al. Toll-Like Receptor 3 Ligand Polyinosinic: Polycytidylic Acid Promotes Wound Healing in Human and Murine Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(8):2085-2092.
16. Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov H, Davis S et al. Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration*. 2017;25(6):912-922.
17. Nery R, Kahlow B, Skare T, Tabushi F, Castro A. Uric Acid and Tissue Repair. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2015;28(4):290-292.
18. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*. 2004;6(15):1382-1387.
19. Poutahidis T, Kearney S, Levkovich T, Qi P, Varian B, Lakritz J et al. Microbial Symbionts Accelerate Wound Healing via the Neuropeptide Hormone Oxytocin. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e78898.
20. Radek, K. and Gallo, R. (2010). Amplifying Healing: The Role of Antimicrobial Peptides in Wound Repair. *Advances in Wound Care*, 1, pp.223-229.
21. Salgado F, Artigiani-neto R, Lopes-filho G. Growth Factors and Cox2 in Wound Healing: an Experimental Study with Ehrlich Tumors. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2016;29(4):223-226.
22. Sato T, Yamamoto M, Shimosato T, Klinman D. Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair and Regeneration*. 2010;18(6):586-593.
23. Scotti E, Boué S, Sasso G, Zanetti F, Belcastro V, Poussin C et al. Exploring the microbiome in health and disease. *Toxicology Research and Application*. 2017;1:239784731774188.
24. Tagliari E, Campos A, Costa-Casagrande T, Salvalaggio P. The Impact of the Use of Symbiotics in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Rat

Model. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo). 2017;30(3):211-215.

25. Vizzotto Junior A, Noronha L, Scheffel D, Campos A. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003;39(2):143-149.

26. Wagner N, Zaparolli M, Cruz M, Schieferdecker M, Campos A. Postoperative Changes in Intestinal Microbiota and use of Probiotics in Roux-en-y Gastric Bypass and Sleeve Vertical Gastrectomy: an Integrative Review. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2018;31(4).

27. Wang J, Hori K, Ding J, Huang Y, Kwan P, Ladak A et al. Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(5):1265-1273.

28. WILGUS T. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. *Pharmacological Research*. 2008;58(2):112-116.

29. World Gastroenterology Organization (WGO), Probiotics and prebiotics. 2017. Available from: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english> [Accessed 16th July 2019]

## 4.2 ARTIGO 2

### **Effects of oral probiotics administration in the expression of TGF<sub>beta</sub>, and the pro-inflammatory cytokines Interleukins 6, Interleukins 17, and TNF<sub>alfa</sub> in skin wounds in rats**

Eliane **Tagliari**<sup>1</sup>, Leticia Fuganti **Campos**<sup>1</sup>, Thais Andrade Costa **Casagrande**<sup>2</sup>, Taise **Fuchs**<sup>2</sup>, Lúcia de **Noronha**<sup>3</sup>, Antonio Carlos L. **Campos**<sup>4</sup>

Graduate Program in Surgery, Division of Health Sciences, Federal University of Paraná<sup>1</sup> Professional Masters Program in Industrial Biotechnology, Positivo University<sup>2</sup> Experimental Pathology Laboratory, Pontifical Catholic University of Paraná<sup>3</sup> Department of Surgery, Federal University of Paraná, Curitiba, Brasil<sup>4</sup>

**Introduction:** Cytokines and growth factors play key roles during the tissue repair process. Alterations in the innate immune defense system of the skin may interfere in the wound healing/*scarring* process. Intestinal microbiota plays an important role in the regulation of growth factors and cytokines expression involved in the cutaneous healing process. The skin is a functional network that involves the microbiota, besides the physical, chemical, and immunological barriers. Probiotics improve the intestinal and the cutaneous immune response by complex immune mechanisms.

**Objective:** To evaluate the effect of perioperative oral administration of probiotics on the cutaneous healing/*scarring* process in rats by histological aspects, and by the expression of TGF<sub>beta</sub>, and the pro-inflammatory cytokines IL<sub>6</sub>, IL<sub>7</sub>, and TNF<sub>-alfa</sub> in

skin wounds.

**Materials and Methods:** Seventy-two adult male Wistar rats weighing approximately  $250 \pm 26,7$  grams were used. Rats were weighed and split into two groups with 36 animals each: one control group (supplemented with maltodextrin 250 mg/day) and one probiotic group (supplemented with a probiotic Probiatop® from FQM-FARMA, Rio de Janeiro – RJ, Brazil, compound with *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM®, at the dose of 250 mg/day, which corresponds to the approximate dose of 200.000 Colony Forming Units (CFU), administered orally once a day, starting 5 days before surgery until the euthanasia day, with the aid of a spatula (mixed in cream cheese). Each group was subdivided into three subgroups with 12 animals each according to euthanasia day: 3<sup>rd</sup> PO day, 7<sup>th</sup> PO day, and 10<sup>th</sup> PO day. Body weight was recorded, rats were killed and the wound was removed with a margin of 1 cm of normal skin for histological studies and for the assessment of the expression of TGF<sub>beta</sub>, and the cytokines TNF<sub>alpha</sub>, IL-6 and IL-17 by immunohistochemistry.

**Results:** Wound contraction was faster with the use of probiotics ( $p=0,013$ ). Also fibrosis was significantly higher in the Probiotic group in the 7<sup>th</sup> PO day ( $p=0.028$ ) when compared to the control group. As for the cytokines, when the control group was compared to the probiotic group, there was a reduction of TNF<sub>alpha</sub> at 3<sup>th</sup> PO day ( $p=0.023$ ); and a reduction of IL6 in 7<sup>th</sup> PO day ( $p=0.03$ ). There was also a reduction of the expression of IL-17 in the 3<sup>rd</sup> PO day ( $p=0,039$ ) and 7<sup>rd</sup> PO day ( $0,024$ ). In contrast, TGF- $\beta$  was lower in the 10<sup>th</sup> PO day ( $p=0.031$ ) in the probiotic group as compared to controls. These results suggest that the use of probiotic attenuated the inflammatory response, by decreasing the expression of the pro-inflammatory

cytokines. TGF<sub>beta</sub> increased in both groups since one of its functions is to organize the provisional matrix through the chemostatic gradient and to guide the organization of the fibers, which can be confirmed with the increase of the fibrosis in the 7PO found in this study. However, TGF<sub>beta</sub> expression was significantly lower in the 10<sup>th</sup> PO day in the probiotic group, suggesting that the healing process in this group was already in its final phase at this period. A possible explanation for this condition would be the "saturation" of fiber compaction mechanisms, indicating that the increase of the fibrosis caused negative feedback with the TGF<sub>beta</sub>.

**Conclusion:** : The oral use of probiotics is associated with a shorter inflammatory phase by attenuating the expression of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF<sub>alpha</sub> and accelerating the reduction of IL-17 and TGF<sub>beta</sub>, leading to a faster and improved cutaneous healing in rats.

**Key-words:** cutaneous healing/scarring, cytokines, probiotics, TGF<sub>beta</sub>.

## INTRODUCTION

Advanced molecular analyzes of the cutaneous microbiota revealed the skin as a symbiotic and delicate ecosystem that controls various functions in the host<sup>1,2</sup>. The cutaneous microbiota interacts with the immune system response and changes in this system interfere with wound/scarring healing<sup>2</sup>. Healing/scarring is a dynamic cellular process involving molecular and biochemical events aimed at tissue reconstitution and can be evaluated by clinical, mechanical, biochemical and histological parameters<sup>3</sup>.

The functions of epithelial cells and fibroblasts are strictly regulated by

cytokines and growth factors<sup>4</sup>. Studies on the intestine-skin axes have been directed to better understanding the effect of intestinal probiotics bacteria and their metabolites on the immunological components involved in cutaneous healing/scarring<sup>4</sup>.

The skin consists of the dermis (the deepest layer) and the epidermis, which is the external layer, acting as the skin barrier<sup>5</sup>. The microbiota is the outermost of the skin barriers composed of several microbial communities, which cover all areas of the skin surface<sup>5</sup>. The acid pH of the surface and its compounds together make up the "*natural hydration factor*" (NHF) and form the chemical barrier. The corneal extract composed of keratinocytes and the tight-junctions (TJ) forms the physical barrier. The immune barrier is the last one that makes up the skin. It consists of resident immune cells, such as antigen-presenting cells (APCs), innate lymphoid cells, keratinocytes, and adaptive immune cells<sup>5</sup>.

Tissue injury often leads to profound Inflammatory, fibrogenic and regenerative responses that are part of a complex and intertwined injury response system that serves to contain damage and to restore and maintain tissue function through recruitment of several types of specialized cells<sup>3,6,7</sup>. Inflammation may be initiated via acellular biochemical reaction cascades such as the complement system and coagulation cascade, and via the activation of resident immune cells. Both lead to the recruitment of circulating white blood cells into the injured tissue and the production of different cytokines, which further amplify inflammation and cell recruitment, or regulate important aspects of tissue repair such as regeneration and fibrogenesis<sup>3</sup>. The inflammatory phase of wound healing resolves within several days and transitions into a regenerative phase, characterized by extracellular matrix production through activated and proliferating fibroblasts, as well as angiogenesis,

re-epithelialization and wound contraction<sup>3,6,7</sup>.

As mentioned above, the inflammatory, fibrogenic and regenerative responses are part of a complex and interwoven system where mediators such as TGF<sub>beta</sub> and inflammatory cytokines are essential for inflammation, wound healing and maintenance of cutaneous homeostasis<sup>6,7</sup>. Probiotics ingested by the oral route could modulate the local and systemic immune response<sup>5</sup>, improve skin wound healing and increase the therapeutic potential for cutaneous scarring treatment<sup>8</sup>.

**OBJECTIVE:** To evaluate the effect of perioperative oral administration of probiotics on wounds healing in rats and expression of TGF<sub>beta</sub> and the proinflammatory cytokines IL6, IL-17 and TNF<sub>alpha</sub>.

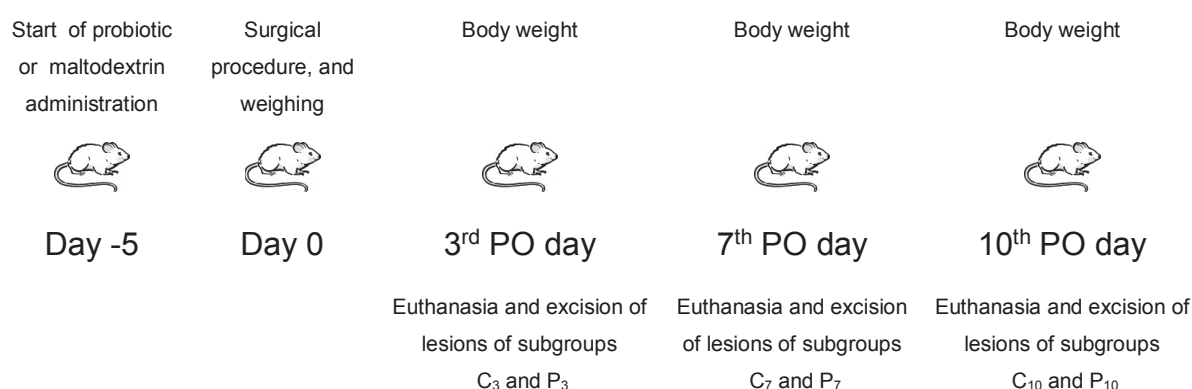
**MATERIAL AND METHODS:** Part of this study has been published previously (Tagliari et al., 2019), where the histological findings and the wound contraction data is show in detail. The animal experiments were carried out in accordance with the norms established by the Brazilian Federal Law No. 11,794, of October 8, 2008, Resolution 196/96 of the National Health Council, according to the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) briefly after approval of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA, number 294) of the Positivo University .

**Animals and Probiotic Administration:** A total of 72 adult male Wistar rats weighing  $250 \pm 26.7$  grams were used. The rats were weighed and divided into 2 groups with 36 animals each, one control groups (which received maltodextrin 250 mg / day) and one probiotic group (the probiotic used was Probiatop<sup>®</sup> from FQM-FARMA (Rio de Janeiro – RJ, Brazil) compound that contained *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup>, at the dose of 250 mg/day. This dosis corresponds to approximately 200,000 to 210,000 CFU (colony forming units),



administered orally once a day, starting 5 days before surgery until the euthanasia day, with the aid of a spatula<sup>10</sup> (mixed in cream cheese). The two groups were subsequently divided into 3 subgroups according to the moment of the euthanasia (3<sup>th</sup> PO day; 7<sup>th</sup> PO day and 10<sup>th</sup> PO day) with 12 rats each.

**Surgical procedure:** After 5 days of preoperative oral administration of either probiotics or maltodextrin, the rats were anesthetized and subjected to an excisional dorsal square wound, standardized by a mold measuring 2.0 x 2.0 cm. The anesthesia was via inhalation (Isoflurane) and then maintained with an association of ketamine hydrochloride 80mg/kg and hydrochloride of xylazine 10mg/kg intramuscularly, being maintained under the inhalation effect of the anesthetic throughout the procedure. After recovery, they were returned to their original cages receiving water and were allowed rat chow *ad libitum*. Liquid acetaminophen was used in a daily dose of 200mg/kg/day orally, until the 4<sup>th</sup> postoperative day. They were evaluated on the 3<sup>th</sup> PO; 7<sup>th</sup> PO and 10<sup>th</sup> PO days as follows:



The wounds were photographed at a standard distance of 15 cm. The analysis and calculation of the areas, in square millimeters, were performed by the Image-Pro<sup>®</sup> Plus software (version 4.5, Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA).

**Euthanasia and collection of materials:** On the 3<sup>rd</sup> (C<sub>3</sub> and P<sub>3</sub>); 7<sup>th</sup> (C<sub>7</sub> and P<sub>7</sub>)

and 10th (C<sub>10</sub> and P<sub>10</sub>) PO days, the rats were submitted to euthanasia in a closed system with isoflurane. Immediately after death, the lesions were excised and the entire wound extension with a 1 cm margin of intact skin were included and stored with 10% formaldehyde in order to preserve their morphological structures for later histological study and collagen densitometry determination.

**Histological analysis:** Histological slides were stained with hematoxylin and eosin (HE). The reading of the slides was performed under an Olympus BX40 optical microscope (Tokyo, Japan), with magnifications of 20x. The presence of edema, congestion and polymorphonuclear cells were indicative of an acute inflammatory process, punctuating negatively, and the formation of fibroblasts, neovascularization and monocytes were findings that indicated a chronic inflammatory process, punctuating positively. After the assignment of the indices, these were added to a total final score for subsequent statistical comparison between the groups<sup>11</sup>.

**Immunohistochemistry:** The excised lesions were embedded in paraffin for later construction of Tissue microarray blocks, in order to optimize immunohistochemical analysis. In the immunohistochemistry reactions, the primary antibody binds to the specific antigen, as follows: **TNF- $\alpha$**  (Tumor Necrosis Factor Alpha (TA20); mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology., Santa Cruz California USA, WB, dilution 1:50); **IL-6** (Interleukin-6, monoclonal mouse, Abcan®, Cambridge MA, USA; clone ab9234, 1:400 dilution); **IL-17** (Interleukin 17; Polyclonal mouse, dog and human; Abcan®, Cambridge MA, USA, clone ab79056; dilution 1:200) and **TGF $\beta$**  (Transformation Factor Beta1, Polyclonal rabbit, Spring Bioscience, Pleasanton, California, USA; N / A, 1:100 dilution). The antigen is recognized by a secondary antibody, to which also binds an enzyme complex (streptavidin-biotin-peroxidase). In the positive reactions, the peroxidase transforms the chromogenic substance in

specific brown color into the matrix, which is recognized as positive within that area and quantified by the system. This specific brown coloration is determined for each of the selected markers by its specific manufacturers. The immunohistochemical technique performed also included dewaxing in warm xylol (37°C), use of methyl alcohol, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the first endogenous peroxidase blockade, followed by distilled water and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the second blockade. Antigen retrieval was performed with BioSB® antigen unmasking solution with citrate in a water-bath at 99°C for 20 minutes. First, the antibodies were incubated overnight at the recommended dilutions. EnVision® + Dual Link / Peroxidase, a dextran polymer of Dakocytomation®, was used for 30 minutes as the secondary antibody. The staining was developed by adding chromogen and DAB substrate to the slides, which were counterstained with Harris's hematoxylin. Positive and negative controls were used for all reactions. The immunolabelled slides were scanned by the Axio Scan.Z1 Scanner. (Zeiss, Germany). Each digitalized sample was individually selected and converted to medium magnification images (20x), excluding the photos following the criterion of filling, folding, tearing, and tissues that did not have interest for the study. The dermal skin band was used. Positive control HPF photomicrography was chosen as the "mask", which contained adequate levels of a positive sign of tissue immunosuppression. The "mask" was then superimposed on the photomicrographs of the samples. Based on the positive tissue immuno-expression signal obtained from the "mask", the Image-Pro Plus (TM) image analysis software was used to identify the positive areas in the samples. We were then able to transform those results into a positive tissue immunoexpression area per square micrometer ( $\mu^2$ ). The area in  $\mu^2$  obtained with this method was divided by the constant of 90.604,96  $\mu^2$ , which is the total HPF observed area, generating than a percentage value for the

area of positive tissue immunoexpression for each HPF. For each case, the average percentage of the positive area was determined in 10 medium increase fields. A 20x increase was used.

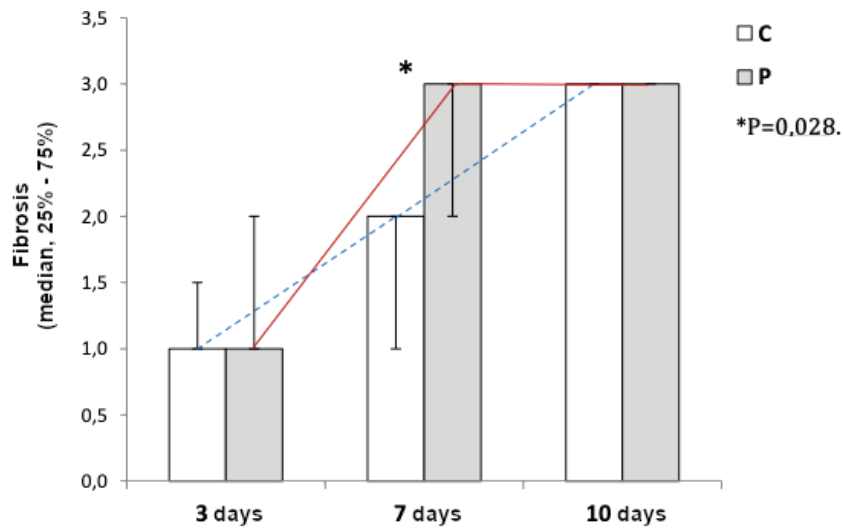
**Statistical analysis:** The results were described by means  $\pm$  standard deviations, medians, minimum and maximum values. For the comparison of the results of probiotic group with the control group on each day of evaluation, the non-parametric Mann-Whitney test was used. The comparisons between the evaluation days, were made using the Kruskal-Wallis non-parametric test. Statistical significance was indicated when  $p$  values were  $< 0.05$ . Data were organized in an Excel database and analyzed with the IBM SPSS Statistics® software, v.20.

## RESULTS

### 1- HISTOLOGICAL ANALYSIS

The histological data described here were published previously, were all the results are shown in detail (Tagliari et al., 2019) <sup>42</sup>. Briefly it was found that fibrosis increased from the 3<sup>rd</sup> PO day to the 7<sup>th</sup> PO day in both groups, but on PO day 7 it was significantly higher in the Probiotic group as compared to the Control group ( $p = 0.028$ ), as shown in Figure 1. (Reproduced from Tagliari et al, 2019, with permission)

**Figure 1.** Comparison of Fibrosis between the Control (C) and Probiotic (P) groups.



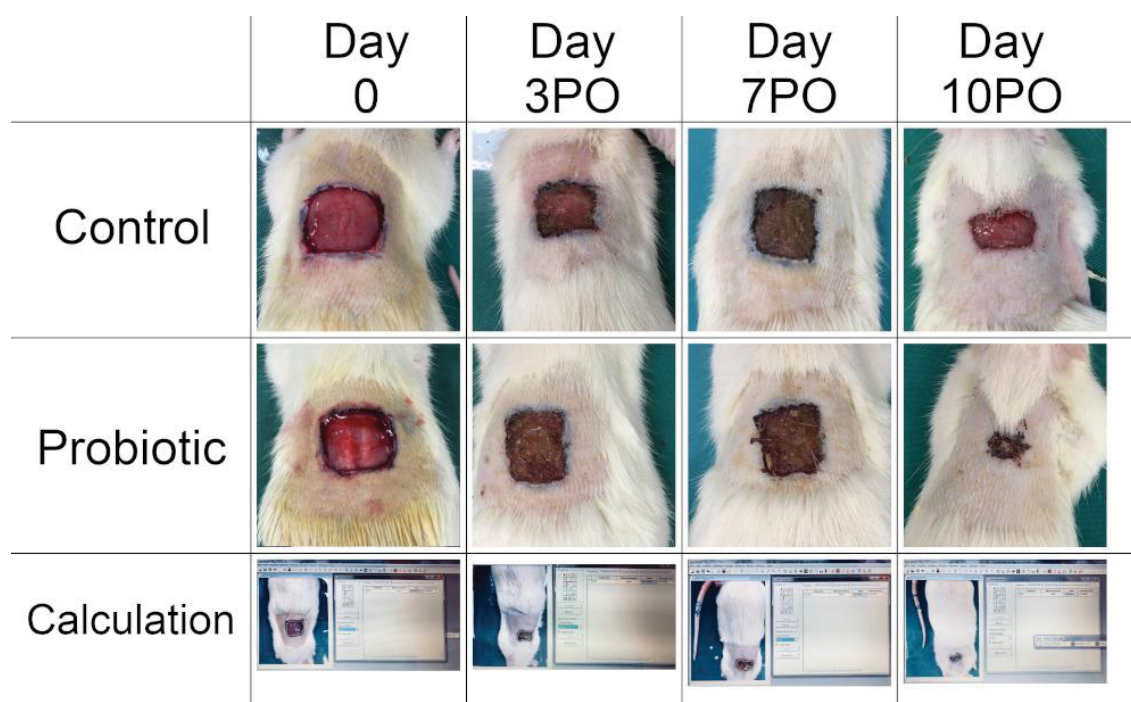
Control group (C) and Probiotic group (P); (median 25%-75%), on 0PO, 3PO, 7PO and 10PO

**Figure 1.** Evolution of Fibrosis in Control Group (C) and Probiotic (P); (median 25% 75%) at postoperative days 3, 7 and 10 (\* p = 0.028).

## 2- WOUND TISSUE AREA

Figure 2 shows the evolution of wound contraction in the control and probiotic groups at times 3PO, 7PO and 10PO respectively. Markedly the area reduction was more pronounced in the probiotic group. Examples of calculating its area in specialized software.

**Figure 2:** Example of wound contraction at 3PO, 7PO, and 10PO respectively.



**Figure 2:** Example of evolution of wound contraction and area calculation at 3PO, 7PO and 10PO respectively.

### 3- TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF-a)

Tumor necrosis factor (TNF<sub>alpha</sub>) decreased over time in both groups in all moments. However, the use of probiotics was associated with a significantly lower level of TNF<sub>alpha</sub> in the 3<sup>th</sup> PO day ( $p=0.023$ ), as shown in Table 1. The interleukin 6 (IL-6) expression increased in both groups over time. The use of probiotic attenuated the expression of IL-6 in the 7<sup>th</sup> PO day ( $p=0.03$ ), as shown in Table 1.

**Table 1. Evaluation of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF<sub>alpha</sub>) and evaluation of expressed IL6 ( mean  $\pm$  standard deviation) in wound area (in  $\mu^2$ ) in both control and probiotic groups on postoperative days 3, 7 and 10.**

Variable	Group	Mean $\pm$ standard deviation						p*
		n	3rd day	n	7th day	n	10th day	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Control	11	4506 $\pm$ 4822 <sup>a</sup>	11	839 $\pm$ 820 <sup>b</sup>	8	101,9 $\pm$ 121,2 <sup>b</sup>	0,003
	Probiotic	12	510 $\pm$ 372 <sup>a</sup>	9	146,7 $\pm$ 170,9 <sup>b</sup>	9	39,4 $\pm$ 44,5 <sup>c</sup>	<0,001
	p** (C x P)		0,023		0,603		0,236	
<b>IL6</b>	Control	11	188,6 $\pm$ 174,4	9	342,6 $\pm$ 261,1	11	569,8 $\pm$ 601	0,184
	Probiotic	11	71,3 $\pm$ 52 <sup>ab</sup>	11	65,9 $\pm$ 65,4 <sup>a</sup>	12	358,6 $\pm$ 420,9 <sup>b</sup>	0,044
	p** (C x P)		0,076		0,003		0,413	

C: Control; P: Probiotic. Comparisons between the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, and 10<sup>th</sup> days: different letters correspond to significative difference ( $p < 0.05$ ). \* Non-parametric Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ . \*\* Non-parametric Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ .

#### **4- INTERLEUKIN 17 (IL17) and TGF<sub>beta</sub> (TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA)**

In both groups, there was a reduction of IL17. In the probiotic group, the reduction of IL-17 was more accentuated in 3<sup>rd</sup> PO day day ( $p=0.039$ ) and 7<sup>rd</sup> PO day (0.024). TGF<sub>beta</sub> increased in both groups over time. However, in the probiotic group, the expression of TGF<sub>beta</sub> was lower in the 10<sup>th</sup> PO day ( $p=0.031$ ), when compared to control group, as shown in Table 2

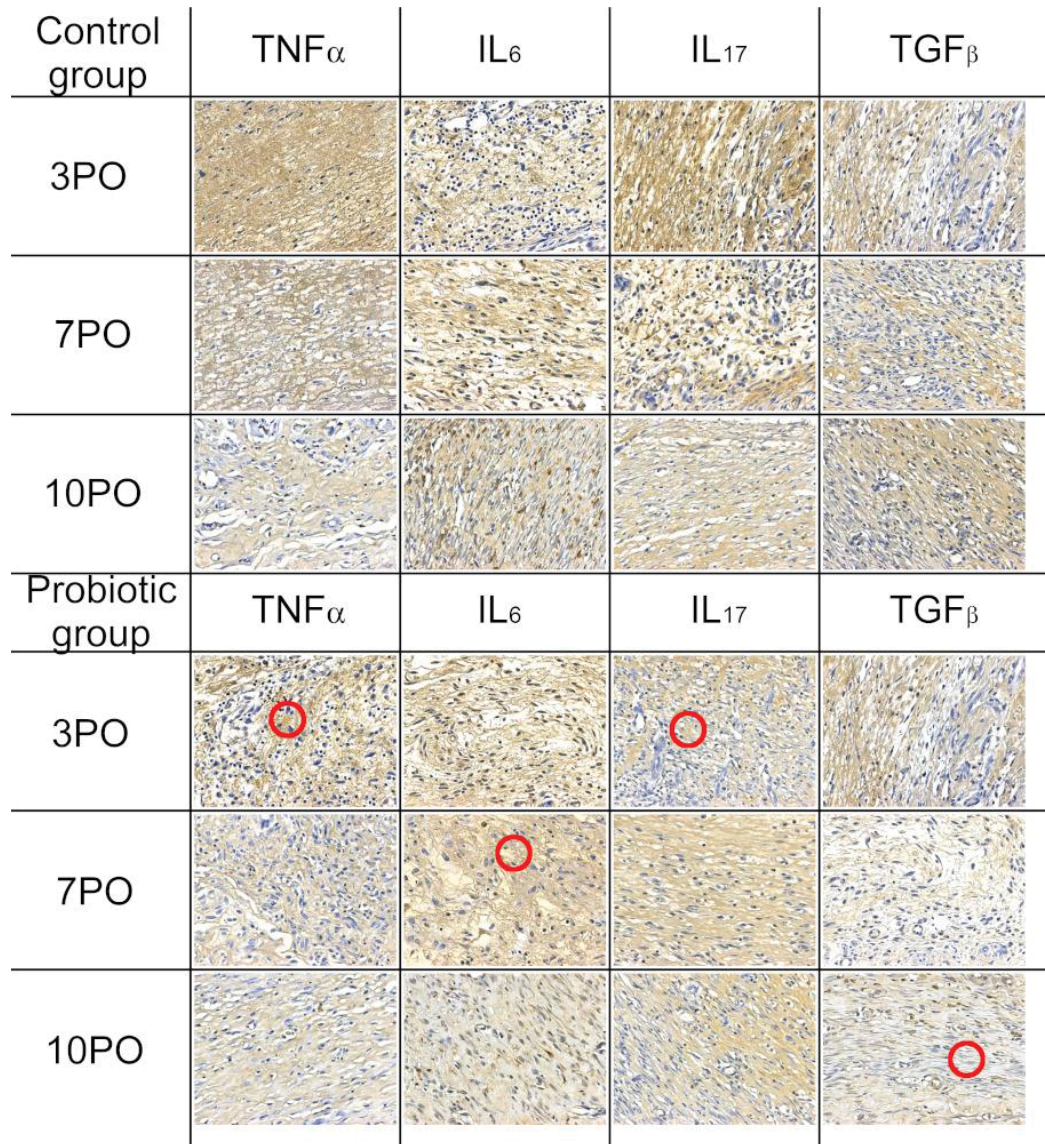
**Table 2. Evaluation of expressed Interleukin 17 (IL17) and evaluation of expressed TGF<sub>beta</sub> (mean  $\pm$  standard deviation) in the wound area ( in  $\mu^2$ ), analyzing the control and probiotic groups at postoperative days 3, 7 and 10.**

Variable	Group	Mean $\pm$ standard deviation						p*
		n	3rd day	n	7th day	n	10th day	
<b>IL17</b>	Control	10	4747 $\pm$ 3385 <sup>a</sup>	11	497 $\pm$ 793 <sup>b</sup>	8	68,0 $\pm$ 104,7 <sup>b</sup>	<0,001
	Probiotic	12	2204 $\pm$ 1529	11	45,9 $\pm$ 53,9	10	44,7 $\pm$ 63,6	<0,001
	p** (C x P)		0,039		0,024		0,887	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Control	10	2101 $\pm$ 1270 <sup>a</sup>	10	3192 $\pm$ 2821 <sup>a</sup>	9	10273 $\pm$ 8092 <sup>b</sup>	0,003
	Probiotic	10	1229 $\pm$ 808 <sup>a</sup>	9	2494 $\pm$ 2072 <sup>a</sup>	11	4507 $\pm$ 2138 <sup>b</sup>	0,003
	p** (C x P)		0,123		0,447		0,031	

C: Control; P: Probiotic. Comparisons between the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, and 10<sup>th</sup> days: different letters correspond to significative difference (p < 0.05). \* Non-parametric Kruskal-Wallis test, p < 0.05. \*\* Non-parametric Mann-Whitney test, p < 0.05.

**Figure 3 - Examples of the immunohistochemistry performed between control and probiotic at times 3PO, 7PO and 10PO, respectively.**





**Figure 3:** Representative photos of the cytokines analyzed and TGF- $\beta$ , highlighting the results found (according to tables 1 and 2) in the probiotic group, when compared with the control, at times 3PO, 7PO and 10PO days, respectively. When analyzing the control group, in all cytokines as well as in TGF- $\beta$  the tissue immune-expression is more concentrated, which characterizes greater inflammation and increase of TGF- $\beta$  growth factor at all times analyzed (3PO, 7PO and 10PO days, respectively), 20x magnification was used.

## DISCUSSION

Researchers aim to understand the relationship between the intestinal microbiota and the immune system to skin health<sup>1</sup>. The intestine and the skin are important neuroendocrine organs for the maintenance of the physiological homeostasis of the organism<sup>4</sup>. Probiotics have pro-healing properties both in the gastrointestinal epithelium and in the skin<sup>4,9,14</sup>. In the skin, probiotics act through epidermal innate immune pathways, where they perform on keratinocytes and Langerhans cells (Lgs), as well as on innate dermal immune cells: dendritic cells (DC), mast cells, macrophages, innate lymphoid cells (ILCs), and T-cells (Tregs). Keratinocytes initiate relevant immunological cascades events (e.g. inflammatory diseases and wound healing<sup>15,40</sup>). In order to restore skin barrier integrity, two prerequisites must be fulfilled: tissue healing is the first step, and then restoration of the microbiome barrier.

Healing is a highly dynamic process involving a complex sequence of cellular and biochemical events. The present study described a model of cutaneous excisional wound healing in rats, comparing the perioperative oral use of probiotics with a control group. Histological and immunohistochemical evaluations of cutaneous wounds were studied in the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> PO time periods.

Throughout the whole experiment, the weight of the animals in both groups evolved similarly. Although there are numerous studies associating the use of probiotics with weight loss, it is known, on the other hand, that different strains are associated with weight gain<sup>9,12</sup>. As described in this study, the use of probiotics for this relatively short period did not present significant differences in weight loss between the analyzed groups.

The functions of the epithelial cells and fibroblasts are strictly regulated by

cytokines and growth factors, and the probiotic barrier fortification of the epidermal barrier is strictly interrelated with its effects on immunological components<sup>13,14,35</sup>.

The histological results of the acute inflammatory process (i.e. interstitial edema and vascular congestion), are less strictly linked to the cell proliferation process, whereas the chronic inflammatory process is histologically related to the infiltrate of polymorphonuclear cells, granulation tissue, and fibrosis<sup>11</sup>. Our findings demonstrated an amplified proliferative phase from the third to the seventh postoperative day, highlighting that the fibrosis process on the seventh day was significantly higher in the probiotic group when compared to the control group. Fibrosis is defined as the interstitial fiber deposit that marks the beginning of the wound healing. The stimulation of the fibrosis process observed with the use of probiotics suggests a faster sub-acute phase in this group, which resulted in an accommodation of the cell matrix fibers in less time and a better organized chronic phase.

Orally ingested probiotics modulate the systemic and local immune response by increasing the Treg cells influx in the cutaneous lymph nodes<sup>4,5</sup>. These cells recognize molecular patterns associated with pathogens and molecular damage (e.g. PAMPs and DAMPs) through Toll-like Receptors (TLRs). TLRs are activated by infection molecular signals or by injuries, and these receptors play a key role by activating the wound healing process and protecting the host of additional damage. Furthermore, TLRs recruit fibroblasts and macrophages for tissue repair and debris removal<sup>4,5,15</sup>. They also activate keratinocytes to respond to microbial signals, producing antimicrobial peptides (AMPs), such as defensins, cathelicidins, and innate immunity receptors<sup>16</sup>. AMPs also stimulate and increase Toll-Like Receptor (TLR) pathways, induce chemokine production, chemotactic activity, and modulate the

function of dendritic cells (DC) and/or T-cells to promote wound healing and maintain homeostasis of the skin barrier<sup>6,16</sup>. TLRs type 2, 3, 4, and 9 were identified as key modulators of wound epithelialization<sup>18,38</sup>.

During the initial stages of healing, the tumoral necrosis factor (TNF<sub>alpha</sub>), a proinflammatory cytokine, which is induced by macrophages, neutrophils, and lymphocytes, plays an important role in the recruitment of other inflammatory cells to the lesion site<sup>17</sup>. Several monocytes and macrophages functions have been linked to the activation of TLRs, where TNF<sub>alpha</sub> is central for the inflammatory response and innate immunity response<sup>18</sup>. Although TNF<sub>alpha</sub> decreased in both groups in all wounded areas, TNF<sub>alpha</sub> expression was lower in the probiotic group. Our results showed that the use of probiotics was associated with less expression of TNF<sub>alpha</sub> at the beginning of the process (3PO) in areas of the wound, which was reflected in the increase in the tissue fibrosis that was observed on the 7<sup>th</sup> PO day. This effect on tissue fibrosis is probably TNF<sub>alpha</sub> dependent, since the proinflammatory cytokine signalizes and interacts with local dendritic cells (DCs) via TLRs. Studies in animals<sup>17,19</sup> have shown that the TNF<sub>alpha</sub> production is decreased with probiotics consumption, contributing therefore to the conclusion of the inflammation process. TNF<sub>alpha</sub> also activates transforming factors to produce IL-6 that also recognizes the presence of DAMPs and PAMPs, via TLRs, at the wound site.

Interleukin 6a (IL-6) is a pleiotropic cytokine with multiple effects. IL-6 is produced by dendritic cells, monocytes, macrophages, mast cells, B-cells, and activated T-cell subsets. IL-6 is also produced by tumor cells, fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes<sup>19</sup>. IL-6 benefits keratinocytes proliferation in the generation of collagen in the dermis by fibroblasts. Immediate and transient expression of IL-6 is generated in response to factors such as infections and tissue lesions<sup>19</sup>. Our results

pointed to an increase in IL-6 in both groups over time. However, the expression of IL-6 in the 7<sup>th</sup> PO day was attenuated in the probiotic group. Again, it corroborates with the result of the increase in tissue fibrosis observed in the 7<sup>th</sup> PO day in the probiotic group, leading to a better resolution of the inflammatory process.

The T-cells responsible for IL-17 production are a subset of Th17 helper cells<sup>20,21</sup>. The combination of the immunoregulatory cytokine TGF<sub>beta</sub> and the proinflammatory and pleiotropic cytokine IL-6 is required to induce IL-17 in virgin T-cells in mice and/or in humans, allowing the cells to communicate with a wide variety of barrier tissues, including the intestine and the skin, leading neutrophils to the site of inflammation<sup>20,22,24</sup>. There was a reduction of IL-17 in both groups over time. Similarly to the other pro-inflammatory cytokines, the most significant reduction of IL-17 was in the probiotic group, in 3<sup>rd</sup> PO (p=0.039) and 7<sup>rd</sup> PO day (p=0.024), indicating a decreased acute process. Other studies show that probiotics administered orally resulted in increased Treg cell frequency in the lymph nodes of the skin<sup>21,22,23</sup>. Foxp3+ Tregs lymphocytes decrease tissue damage at the edge of the wound by reducing inflammatory cytokine IL-17<sup>25,26</sup>. Konkel et al. (2017) demonstrated in animals that the lack of TGF<sub>beta</sub> signals in Foxp3+ Treg cells increased IL-17 production in specific tissues such as in the gut and skin<sup>29</sup>.

Wound healing is an essential and orchestrated process to maintain homeostasis and the functionality of tissues and organs. The process is dynamic and regulated by different cell types and growth factors that help the extracellular matrix (ECM) components to restore the injured tissue<sup>27</sup>. This communication between the ECM components and the growth factors is time and context dependents, whose dynamic reciprocity plays an essential role in the positive tissue response<sup>27</sup> and these are substances that modulate the healing process<sup>6</sup>.



Transforming Growth Factor-Beta (TGF-beta) is a multifunctional growth factor with different isoforms, employing pleiotropic effects at all stages of wound healing<sup>6,7</sup>. TGF<sub>beta</sub> signaling is important for re-epithelialization, inflammation, angiogenesis, and granulation tissue formation during wound healing<sup>28</sup>. Following an injury process, high amounts of TGF<sub>beta</sub> are released into the injured tissue by platelets that recruit innate immune cells and then stimulate the fibroblasts proliferation<sup>7,29</sup>. Fibroblasts, under the control of TGF<sub>beta</sub>, organize the temporary extracellular matrix (MEC) enriched with fibronectin, matricellular proteins, collagen, and peptidoglycans (PGs). As the fibroblasts are deposited in the wound bed, they begin to produce fibrous ECM enriched with fibrillar collagen type III. The deposition of collagen and PGs contribute to the fibrillar organization. This provisional matrix is replaced by a MEC rich in fibrillar type I collagen. The PGs function as sensors and help fibroblasts to transform into myofibroblasts and promote wound contraction<sup>07,28,29</sup>. Our findings demonstrated that TGF<sub>beta</sub> increased in both groups over time. However, in the probiotic group, TGF<sub>beta</sub> expression was lower in 10<sup>th</sup> PO(p=0.031) day, suggesting a faster inflammatory phase. There are conflicting data on the *pro* or *anti*-fibrotic nature of TGF-beta<sup>27,31</sup>, suggesting that as more TGF<sub>beta</sub> pathway levels are reached by a compound (i.e. by the probiotics oral consumption), probably via TLRs (through recruitment of cytokines and TGF<sub>beta</sub>) the more efficient the interference<sup>27,28</sup>. The presence of TLRs increases the sensitivity of fibroblasts to the stimulatory effect of TGF<sub>beta</sub> and the activation of TLRs modifies the expression of genes involved in ECM remodeling, tissue repair and wound healing<sup>42</sup>. TGF<sub>beta</sub> levels in the intestine are modulated directly and indirectly by the intestinal microbiota, which affects the development and functions of immune cell subsets in peripheral tissues, including the skin<sup>29,31,36,37</sup>.

Another possible mechanism that explains our results refers to the role of the mechanical properties and biosynthesis of the ECM components, among them the peptides-glycans (PGs), which interact with different molecules of the ECM, cellular receptors, cytokines, and growth factors such as TGF<sub>beta</sub><sup>33,34</sup>. PGs play a critical role in collagen fibrinogenesis and their fibers' adequate architecture, thanks to cell-matrix interactions, as well as collagen deposition<sup>29,33</sup>. PGs bind to TGF<sub>beta</sub> acting as a natural inhibitor of this growth factor, buffering their function during wound healing in order to prevent excessive fibrosis. A plausible explanation for this situation would be the mechanisms "saturation" of fiber compaction<sup>41</sup>, where increased fibrosis (i.e. found in 7<sup>th</sup> PO day) caused negative feedback with TGF<sub>beta</sub>. Furthermore, PGs can bind to TLR receptors by modulating cell signaling and endorsing proinflammatory secretion mediators involved in wound healing by regulating excessive angiogenesis, cell proliferation, and extracellular matrix production in the lesion bed<sup>40</sup>. We suggest a possible association between increased fibrosis seen on the 7<sup>th</sup> PO day in the group supplemented with probiotic and the reduction of TGF<sub>beta</sub> seen on the 10<sup>th</sup> PO day, also mediated by the presence of PGs via TLRs regulating their activity. Further studies are necessary to confirm this mechanism, but the results found here confirm that oral probiotic use resulted in a lower level of TGF<sub>beta</sub> on the 10<sup>th</sup> postoperative day, suggesting a faster inflammatory phase, which was confirmed by the results of the other cytokines analyzed here.

Probiotics have pro-healing properties in the gastrointestinal epithelium and also in the skin<sup>3,37,39</sup>. According to a meta-analysis<sup>37</sup> using *in vivo* data in controlled studies, by testing the effectiveness of probiotics as a pharmacological treatment of cutaneous wounds in animal models, the potential use of probiotics in the treatment of wounds and ulcers should be taken into account<sup>39</sup>.

Self-limited and strictly regulated inflammation is an initial step for proper wound repair, where chronic inflammatory responses can lead to excessive scarring and loss of the regeneration process<sup>41</sup>. Our results confirm a faster and more organized inflammatory process associated with the perioperative oral administration of probiotics, probably associated with the attenuation of the expression of the proinflammatory cytokines, since one of the inflammatory process functions is to organize the provisional matrix through the chemostatic gradient and fibers orientation, improving the contraction of the wound. This suggests that the oral use of the probiotic was able to attenuate the expression of IL-6 and TNF<sub>alpha</sub> and also accelerates the reduction of IL-17 and TGF<sub>beta</sub>, resulting in enhanced wound healing in rats, as shown in figure 4.

The skin wound healing process is not yet fully exhausted and new knowledge gaps to be answered arise for a better understanding of healing, including the action of probiotics on all aspects of cutaneous healing.

**CONCLUSION:** The oral use of probiotics is associated with a shorter inflammatory phase by attenuating the expression of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF<sub>alpha</sub> and accelerating the reduction of IL-17 and TGF<sub>beta</sub>, leading to a faster and improved cutaneous healing in rats.

#### **References:**

- 1- B. Hinz, The role of myofibroblasts in wound healing, Current research in translational medicine, 64 (2016) 171-177.
- 2- Baurecht, H. et al. (2018) Epidermal lipid composition, barrier integrity and eczematous inflammation are associated with skin microbiome configuration. J Allergy Clin Immunol Published online 5 February, 2018.



- <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.019>.
- 3- Byrd, A.L. et al. (2018) The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 143–15.
  - 4- Byrd, A.L. et al. (2018) The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 143–15.
  - 5- Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 2007; 20(1): 51–58. [L]  
[SEP]
  - 6- Castillo NA, Perdigón G, de Moreno de Leblanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol* 2011;11:177.
  - 7- Catherine A. O'Neill, Giovanni Monteleone, John T. McLaughlin and Ralf Paus. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. *Bioessays* 8: 1167–1176, " 2016 WILEY Periodicals, Inc.
  - 8- Chester D., A.C. Brown, The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair, *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 60-61 (2017) 124-140.
  - 9- Deckers, J. et al. (2017) Interplay between barrier epithelial cells and dendritic cells in allergic sensitization through the lung and the skin. *Immunol. Rev.* 278, 131–144 [L]  
[SEP]
  - 10- F. Drissi et al. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial Pathogenesis* 106 (2017) 182/194.  
[.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.006)
  - 11-Finnson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. *Adv Wound Care* 2013; 2: 195–214.
  - 12-Fritz, Y. et al. (2017) Induction of alternative proinflammatory cytokines accounts for sustained psoriasiform skin inflammation in IL-17C+IL-6KO mice. *J. Invest. Dermatol.* 137, 696–705 .

- 13- Gudadappanavar AM, Hombal PR, Timashetti SS, Javali SB. Influence of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on wound healing in male Wistar rats - an experimental study. *Int J Appl Basic Med Res*. 2017;7(4):233–238. doi:10.4103/ijabmr.IJABMR\_329\_16
- 14- Katharina, Wolz Christiane, Krismer Bernhard, Peschel Andreas, Schittek Birgit. Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *Journal of Dermatological Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.003> .
- 15- Kiritsi Dimitra, Alexander Nystro'm. TGF beta in wound healing pathologies. *Mechanisms of Ageing and Development* . doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.004
- 16- Konkel et al., 2017, Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses *Immunity* 46, 660–674, April 18, 2017 Published by Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.015>
- 17- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, et al. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce pro inflammatory TH17 cells. *Nature* 448:484–87
- 18- Korn Thomas, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka, and Vijay K. Kuchroo. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27:485–517
- 19- L.E. Tracy, R.A. Minasian, E.J. Caterson, Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound, *Advances in wound care*, 5 (2016) 119-136.
- 20- Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 2012; 13: 991–999.
- 21- Levkovich T, Poutahidis T, Smillie C, Varian BJ, Ibrahim YM, Lakritz JR, et al. Probiotic bacteria induce a 'glow of health'. *PLoS One* 2013;8(1):e53867.
- 22- Li, H. et al. (2017) Skin commensal *Malassezia globosa* secreted protease attenuates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *J Invest Dermatol* Published online 12 December, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.034>
- 23- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, et al. 2006.

- Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage.  
*Nature* 441:231–34 [L]  
 [SEP]
- 24- Masashi ,Toshio Tanaka ;Narazaki and Tadamitsu Kishimoto. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014;6:a016295.
- 25- Meisel, J.S. et al. (2018) Commensal microbiota modulate gene expression in the skin. *Microbiome* 6:20, DOI [10.1186/s40168-018-0404-9](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0404-9)
- 26- Michael K. Lichtman, MD; Marta Otero-Vinas, PhD Vincent Falanga, MD, FACP Transforming growth factor beta (TGF-b) isoforms in wound healing and fibrosis *Wound Rep Reg* (2016) 24 215–222
- 27- Nikitorowicz-Buniak J, Denton CP, Abraham D, Stratton R. Partially evoked epithelial-mesenchymal transition (EMT) is associated with increased TGFb signaling within lesional scleroderma skin. Feghali-Bostwick C, editor. *PLoS One* 2015; 10: e0134092
- 28- P.J. Wipff, D.B. Rifkin, J.J. Meister, B. Hinz, Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix, *The Journal of cell biology*, 179 (2007) 1311-1323. [L]  
 [SEP]
- 29- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in wound healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3(7):445-64
- 30- *Patrice D. Cani*. Gut microbiota — at the intersection of everything? *Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology* .Volume 14 | june 2017doi:10.1038/nrgastro.2017.54
- 31- Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, et al. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One* 2013;8(10):e78898.
- 32- Rocha AMI, Oliveira RG, Farias RE, Andrade ICF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81(2):150– 6.
- 33- Roulis M, Armaka M, Manoloukos M, Apostolaki M, Kollias G. Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause

- murine Crohn- like pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(13):5396-401.
- 34-Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. J Dermatol Sci 2004; 35: 83–92.
- 35- Stefanie Eyerich, Kilian Eyerich, Claudia Traidl-Hoffmann, and Tilo Biedermann. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network Trends in Immunology, Cell 2019, <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.02.004>
- 36-Swati Bhattacharyya,<sup>1,\*</sup> Kim S. Midwood,<sup>2</sup> Hang Yin,<sup>3</sup> and John Varga<sup>1,\*</sup> Toll-like Receptor-4 Signaling Drives Persistent Fibroblast Activation and Prevents Fibrosis Resolution in Scleroderma. Adv Wound Care (New Rochelle). 2017 Oct 1; 6(10): 356–369. Published online 2017 Oct 1. doi: 10.1089/wound.2017.0732
- 37- TAGLIARI Eliane, Antonio Carlos CAMPOS, Thais Andrade COSTA-CASAGRANDE, Paolo Rogério SALVALAGGIO. The Impact of The Use of Symbiotics in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Rat Model . ABCD Arq Bras Cir Dig Original Article 2017; 30(3):211-215 <sup>FILED</sup> DOI: /10.1590/0102-6720201700030011.
- 38- Tagliari E., Campos L.F., Campos A.C., Casagrande T. A.C; Noronha L. *Effect of probiotic oral administration on skin wound healing in rats*. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, SP (2019) DOI:/ 15.1590/0102-67202019001e1457)
- 39- Tsiouris Christos G., Martha Kelesi, e tal.; The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds: Meta-analysis of animal studies. Phasci(2017), doi: 10.1016/j.ejps.2017.04.002
- 40-Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 2006; 24: 179–189.
- 41- Vizzoto Junior AO, de Noronha L, Scheffel SLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de

anastomoses colônicas em ratos. J. Bras. Patol. Med. Lab.; 2003, 39(2):143-49.

- 42- Zoi Piperigkou, Martin Götte, Achilleas D. Theocharis, Nikos K. Karamanos, Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017), doi:10.1016/j.addr.2017.10.008


## 5 CONCLUSÃO

O uso oral perioperatório de probióticos em ratos está associado com uma cicatrização cutânea mais rápida, com fase inflamatória mais rápida, antecipação da fibrose e maior deposição de colágeno. Os mecanismos envolvidos possivelmente incluem a atenuação da resposta inflamatória, pois houve atenuação da expressão de IL6 e TNF-*alfa* e aceleração da redução da IL17 e do TGF-*beta*.

### CONCLUSÕES ESPECÍFICAS:

- O uso de probióticos não influenciou a evolução do peso corporal;
- A contração da ferida foi maior no grupo suplementado com probiótico, o que resultou em um fechamento mais rápido da área da ferida, quando comparado com o controle.
- Histologicamente o uso de probióticos associou-se a abreviação da fase aguda da cicatrização e antecipação da fibrose na ferida, corroborando com o fechamento mais rápido da mesma.
- A deposição de colágeno na ferida foi estimulada pelo uso de probióticos: (tipo III no 7 dia e tipo I no 10 dia);
- Segundo os achados histológicos o grupo probiótico apresentou uma fase aguda mais rápida no 7º PO e com parâmetros crônicos estáveis no 10º PO, quando comparados com grupo controle.
- O uso oral de probióticos atenuou a expressão de IL6 e TNF-*alfa* e acelerou a redução da IL17 e do TGF-*beta*.

## REFERÊNCIAS

1. ALAM A, et al. **Redox signaling regulates commensal-mediated mucosal homeostasis and restitution and requires formyl peptide receptor 1.** *Mucosal Immunol.*, 7(3):645-55, 2014.
2. ANDRIAN TSOANIRINA, V.; ALLANO, S.; BUTEL, M. J. **Tolerance of Bifidobacterium human isolates to bile, acid and oxygen.** *Anaerobe*, 21(4):39-42, 2013.
3. AYDEMIR, E.A., et al. **Glycyrrhiza flavescens subsp. antalyensis exerts antiproliferative effects on melanoma cells via altering TNF- alfa .** *Food Chem. Toxicol*, 49: 820-828, 2011.
4. BELKAID, Y. & TAMOUTOUNOUR, S. **The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity.** *Nat. Rev. Immunol.* 16, 353–366 2016. 
5. BENSON K, et al. **Probiotic metabolites from Bactillus coagulans GanedenBC30 support maturation of antigen-presenting cells in vitro.** *W J Gastro.*, 18 (16) :1875–83, 2012.
6. BENYACOU B J, et al. **Immune modulation property of Lactobacillus paracasei NCC2461 (ST11) strain and impact on skin defenses.** *Benef Microbes*, 5:129–36, 2014.
7. BORKOWSKI AW, GALLO RL. **UVB radiation illuminates the role of RTL3 in the epidermis.** *J Invest Dermatol.*,134(9):2315-20, 2014.
8. BROUGHTON, G. ; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. **The basic science of wound healing.** *Plast Reconstr Surg*, 117(7 Suppl):12S-34S, 2006.
9. BROUGHTON, G. 2ND; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. **Wound healing: an overview.** *Plast Reconstr Surg*, 117(7 Suppl):1eS-32eS, 2006.
10. CAMPOS, A.C.; GROTH, A.K.; BRANCO, A.B. **Assessment and nutritional aspects of wound healing.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11(3):281-8, 2008
11. CANESSO MARIA C. C., ANGÉLICA T. VIEIRA, TIAGO B. R. CASTRO, BRÍGIDA G. A. SCHIRMER, DANIEL CISALPINO, FLAVIANO S. MARTINS, MILENE A. RACHID, JACQUES R. NICOLI, MAURO M. TEIXEIRA AND

- LUCÍOLA S. BARCELOS. **Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota** *Journal Immunol.*, 193:5171-5180, 2014.
12. CHENG L, GUO S, RANZER MJ, DIPIETRO LA. **Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing.** *J Invest Dermatol.*, 133(1):258-67, 2013.
  13. CHRISTENSEN GJ, BRÜGGEMANN H. **Bacterial skin commensals and their role as host guardians.** *Benef Microbes*, 1;5(2):201-15, 2014.
  14. CLARK, R.A.F. **Wound repair.** In: KUMAR, ROBBINS, COTRAN. *Pathologic Basis of Disease*, 7:112, 2005.
  15. COLE P. et al. **The skin and subcutaneous tissue.** In: SCHWARTZ, M. D. (Ed.). *Schwartz's Principles of Surgery*. 9: The McGraw-Hill Companies, Inc. cap. 16, 2010.
  16. DETHLEFSEN, L., et al. **An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease.** *Nature*, 449:811–818, 2007.
  17. FIERER, N., HAMADY, M., LAUBER, C. L. & KNIGHT, R. **The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 17994–17999, 2014.
  18. FINNISON KW, MCLEAN S, DI GUGLIELMO GM, PHILIP A. **Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring.** *Adv Wound Care*, 2: 195–214, 2013.
  19. GALLEY et al., **Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota.** *BMC Microbiology*, 14:189, 2014.
  20. GALLO, R.L. **Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes.** *J. Invest. Dermatol*, 137: 1213–1214, 2017.
  21. GARDNER SE, HILLIS SL, HEILMANN K, SEGRE JA, GRICE EA. **The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors.** *Diabetes*, 62(3):923-30, 2013.
  22. GRICE E, SEGRE J. **Interaction of microbiome and the innate immune response in chronic wounds.** *Adv Exp Med Biol*, 946:55–68, 2012.
  23. GRICE E, SEGRE J. **The skin microbiome.** *Nat Rev Microbiol*, 9:244–253, 2011.



24. GRICE, E. A. et al. **A diversity profile of the human skin microbiota.** *Genome Res.*, 18:1043–105, 2008.
25. GRICE, E. A. et al. **Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome.** *Science*, 324:1190–1192, 2010.
26. GRICE, E. A. et al., **Human skin microbiota Genome.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, on cshlp.org, acessado em 11 de fevereiro de 2015.
27. GUDADAPPANAVAR A. M., HOMBAL P. R., TIMASHETTI S. S., JAVALI S. B., **Influence of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus plantarum on wound healing in male Wistar rats - an experimental study.** *Int J Appl Basic Med Res.*, 7(4):233–238, 2017.
28. GUENICHE A, et al. **Lactobacillus paracasei CNCM I-2166 (ST11) inhibits substance P-induced skin inflammation and accelerates skin barrier function recovery in vitro.** *Eur J Dermatol.*, 20: 731–737, 2010.
29. HACINI-RACHINEL G, GHEIT H, LE LUDUEC JB, DIF F, NANCEY S, KAISERLIAN D. **Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells.** *PLoS One*, 4:e 4903, 2009.
30. HILL, COLIN et al. **The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.** *Nature Rev Gastroenterol. & Hepatol.*, 66(5):407–415, 2014.  
HOLMES CASEY J., JENNIFER K. PLICHTA, RICHARD L. GAMELLI, AND KATHERINE A. RADEK **Dynamic Role of Host Stress Responses in Modulating the Cutaneous Microbiome: Implications for Wound Healing and Infection.** *Advances in Wound Care*, Volume 4, Number 1, 2015.
31. HYUN MEE KIM, DONG EUN LEE, SOO DONG PARK, YONG-TAE KIM, YU JIN KIM, JI WOONG JEONG, SUNG SIK JANG, YOUNG-TAE AHN, JAE-HUN SIM, CHUL-SUNG HUH, DAE KYUN CHUNG, JUNG-HEE LEE . **Oral Administration of Lactobacillus plantarum HY7714 Protects Hairless Mouse Against Ultraviolet B-Induced Photoaging.** *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(11), 1583–1591, 2014.
32. JENSEN G, BENSON K, CARTER S, ENDRES J. GANEDEN. **BC30 cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro.** *BMC Immunol.*, 11:15, 2010.

33. JIA SIN ONG ;TODD D. TAYLOR; CHENG CHUNG YONG; BOON YIN KHOO ; SREENIVASAN SASIDHARAN; SY BING CHOI HIROSHI OHNO ; MIN TZE LIONG. **Lactobacillus plantarum USM8613 Aids in Wound Healing and Suppresses Staphylococcus aureus Infection at Wound Sites.** Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019.
34. JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. **Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy.** Arch Histol J, 41:267-74, 1978.
35. KIM J, KRUEGER JG. **The immunopathogenesis of psoriasis.** Dermatol Clin., 33(1):13-23, 2015.
36. KIM, JONG-HWA; KIM, KIYOUNG; KIM, WON YONG. **Cream Cheese-Derived Lactococcus chungangensis CAU 28 Modulates the Gut Microbiota and Alleviates Atopic Dermatitis in BALB/c Mice.** Scientific Reports, volume 9, Article number: 446, 2019.
37. KLEERBEZEM, M., et al. **The extracellular biology of the lactobacilli.** FEMS Microbiol, 34(2):199–230, 2010.
38. KOMATSU N. et al. **Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender.** J Invest Dermatol, 125:1182–118, 2005.
39. KORN T, et al. **IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells.** Nature 448:484–87, 2007.
40. KORN THOMAS, ESTELLE BETTELLI, MOHAMED OUKKA, VIJAY K. KUCHROO. **IL-17 and Th17.** Cells. Annu. Rev. Immunol. 27:485–517, 2009.
41. LAI Y, et al. **Activation of TLR2 by a small molecule produced by Staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defense against bacterial skin infections.** J Invest Dermatol, 130: 2211-21, 2010.
42. LAI Y, GALLO RL. **Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases.** Infect Disord Drug Targets, 8:144–155, 2008.
43. LAM, S.Y., et al. **Chronic intermittent hypoxia induces local inflammation of the rat carotid body via functional upregulation of proinflammatory cytokine pathways.** Histochem. Cell Biol. 137: 303-317, 2012.

44. MANGAN P. R. et al. **Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage.** *Nature* 441:231–34, 2006.<sup>[L]<sub>SEP</sub>]</sup>
45. MASASHI, TOSHIO TANAKA; NARAZAKI, TADAMITSU KISHIMOTO. **IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease.** Cold Spring Harb Perspect Biol 2014;6:a016295 .
46. MEISEL, J.S. et al. **Commensal microbiota modulate gene expression in the skin.** *Microbiome*, 6: 20, 2018.
47. METCHNIKOFF E. **The prolongation of life.** London: Heinemann; 1907.<sup>[L]<sub>SEP</sub>]</sup>
48. MEYER M., et al., **FGFRs in keratinocyte migration and wound repair,** *Journal of Cell Science* 125, 5690–5701, 2012.
49. MICHAEL K. LICHTMAN, MD; MARTA OTERO-VINAS, PHD VINCENT FALANGA, MD, **Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis.** *Wound Rep Reg*, 24 215–222, 2016.
50. NAIK, S. *et al.* **Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature.** *Nature* 520, 104–108, 2015.
51. NASRABADI MH, ABOUTALEBI H, EBRAHIMI MT, ZAHEDI F. **The healing effect of Lactobacillus plantarum isolated from Iranian traditional cheese on gastric ulcer in rats.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011:1446-51, 2011.
52. NGUYEN ALAN V., ATHENA M. SOULIKA. **The Dynamics of the Skin's Immune System.** *Int. J. Mol. Sci*, 20: 1811, 2019.
53. NICOTRA L, LORAM LC, WATKINS LR, HUTCHINSON MR. **Toll Like receptors in chronic pain.** *Experimental Neurology*, 234(2):316-29, 2012.
54. OH J, et al. **Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis.** *Genome Res.*, 22:850–9, 2012.
55. PASOLLI EDOARDO, FRANCESCO ASNICAR, SERENA MANARA, CHRISTOPHER QUINCE, CURTIS HUTTENHOWER, NICOLA SEGATA; **Cell** 176, 649–662<sup>[L]<sub>SEP</sub>]</sup> January 24, 2019.
56. PELLATON C, et al. **Intragastric and intranasal administration of Lactobacillus paracasei NCC2461 modulates allergic airway**

- inflammatory in mice.** *Int J Inflamm.*, 2012:686739, 2012.
57. PENN JW, GROBBELAAR AO, ROLFE KJ. **The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review.** *Int J Burns Trauma*, 2: 18–28, 2012.
  58. POUTAHIDIS, T., KEARNEY, S. M., LEVKOVICH, T., QI, P., VARIAN, B. J., LAKRITZ, J. R., IBRAHIM, Y. M., CHATZIGIAGKOS, A., ALM, E. J., ERDMAN, S. E. **Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin.** *Plos One* 8(10), e78898, 2013.
  59. RODRIGUES KL, CAPUTO LR, CARVALHO JC, EVANGELISTA J, SCHNEEDORF JM. **Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract.** *Int J Antimicrob Agents*, 25(5):404-8, 2005.
  60. SANDRINE P. CLAUS AND JONATHAN R. SWANN. **Nutrimetabonomics: Applications for Nutritional Sciences, with Specific Reference to Gut Microbial Interactions.** Review in Advance, January 3, 2013.
  61. SANFORD JAMES A., RICHARD L. GALLO. **Functions of the skin microbiota in health and disease.** *Semin Immunol*, 25(5): 370–377, 2013.
  62. SCALES BS, HUFFNAGLE GB. **The microbiome in wound repair and tissue fibrosis.** *J Pathol.*, 229(2):323-31, 2013.
  63. SCHARSCHMIDT, T. C. & FISCHBACH, M. A. **What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome.** *Drug Discov. Today Dis. Mech*, 10, e83–e89, 2013.
  64. SCHILLER M, JAVELAUD D, MAUVIEL A. **TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing.** *J Dermatol Sci*, 35: 83–92, 2004.
  65. SCHWACHA MG, ZHANG Q, RANI M, CRAIG T, OPPELTZ RF. **Burn enhances Toll like receptor induce responses by circulating leukocytes.** *Inter J Clin Exper Med*, 5(2):136-44, 2012.
  66. SHU M, et al. **Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a Commensal**

- Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** PLoS ONE, 8(2): e55380, 2013.
67. SUGIMOTO S, ISHII Y, IZAWA N, MASUOKA N, KANO M, SONE T, CHIBA K, MIYAZAKI K, ISHIKAWA F. **Photoprotective effects of *Bifidobacterium breve* supplementation against skin damage induced by ultraviolet irradiation in hairless mice.** Photodermatol Photoimmunol Photomed 28: 312-319, 2012.
  68. TORRES, L.F.B.; SLUMINSKY, B.G.; TIRONI, F.A.; NORONHA, L.; GIRON, R.L.; TELLES, J.E Q. **Contribuição da imunohistoquímica em patologia cirúrgica: experiencia de 10 anos.** Rev Med Paraná, 56(2/2): 31-38, 1998.
  69. VALDÉZ JC, PERAL MC, RACHID M, SANTANA M, PERDIGÓN G. **Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment.** Clin Microbiol Infect, 11(6):472-9, 2005.
  70. VAN NOOD, E.; VRIEZE, A.; NIEUWDORP, M.; FUENTES, S.; ZOETENDAL, E. G.; DE VOS, W. M.; VISSER, C. E.; KUIJPER, E. J.; BARTELSMAN, J. F.; TIJSSEN, J. G. **Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*.** N Engl J Med, 368:407–415, 2013.
  71. VARIAN BJ, et al. **Microbial Lysate Upregulates Host Oxytocin.** Brain Behav Immun., 61:36- 49, 2017.
  72. VIZZOTO JUNIOR A. O., DE NORONHA L., SCHEFFEL S. L. H., CAMPOS A. C. L., **Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.** J. Bras. Patol. Med. Lab., 39(2):143-49, 2003.
  73. WANG J, et al., **Toll-like receptors expressed by dermal fibroblast contribute to hypertrophic scarring.** J Cell Physiol., 226(5):1265-73, 2011.
  74. WERNER, B. **Indicações e contribuição diagnóstica da imunohistoquímica em patologia cirúrgica.** Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2002.
  75. WGO - **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de**

**Gastroenterologia-** Probióticos e Prébióticos, Fev. 2017.

76. WONG, V. W., MARTINDALE, R. G., LONGAKER, M. T., GURTNER, G. C.  
**From germ theory to germ therapy: skin microbiota, chronic wounds, and probiotics.** Plastic and Reconstructive Surgery, 132(5), 854e-861e, 2013.
77. ZHAO Y, et al. **GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3.** *Mucosal Immunol.*,11(3):752-762, 2018.

## ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Profª Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300  
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290  
Fax: (41) 317-3030  
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 294

### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

#### IDENTIFICAÇÃO

Influência da suplementação perioperatória de para probiótico na cicatrização de feridas em ratos, mediante densitometria do colágeno
---

#### PROFESSOR ORIENTADOR

ELIANE TAGLIARI

#### INSTITUIÇÃO DO PESQUISADOR

Universidade Positivo

#### ALUNOS ENVOLVIDOS

ELIANE TAGLIARI

#### OBJETIVO

Verificar se o uso de simbióticos via oral melhora feridas subcutâneas em ratos, mediante densitometria do colágeno. Como objetivos específicos tem como propósito avaliar a alteração nos marcadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina17 (IL17), fator de crescimento vascular ( VGEF) e fator de crescimento de transformação beta(TGF $\beta$ ) por imunohistoquímica; Avaliar histologicamente (por HE) o grau de cicatrização epitelial nas 3 fases de cicatrização: inflamatória, proliferativa e de maturação ; Avaliar densitometria do colágeno neoformado, tipo I e tipo III ; Avaliar a morfometria das cicatrizes em tempos diferentes ( 3, 7, e 10 dias); Os ratos serão submetidos a uma de lesões cutânea – feridas excisionais dorsais para estudos de planigrafia, por punch de 1,5cmx1,5cm. Avaliar o peso dos animais em 3 tempos (início, 7 e 10 dias), afim de verificar se o uso do simbiótico altera o peso dos animais.

#### SÍNTESE DO PROJETO

A pele é um ecossistema variado composto por 1,8 m<sup>2</sup> de tecido que recobre todo o corpo, rica em dobras, anexos cutâneos e contém uma microbiota diversificada. A percepção da pele como um ecossistema - composto de componentes biológicos vivos e localizado em diferentes sítios, explica o delicado equilíbrio entre hospedeiro e micro organismos. A cicatrização é um processo celular dinâmico que envolve eventos moleculares e bioquímicos visando a reconstituição tecidual. As complexas interações entre nutrição, função da barreira da mucosa e imuno regulação estão sendo cada vez mais estudadas e formulações específicas com nutrientes e micro-organismos são fundamentais no sucesso da cicatrização. A microbiota intestinal parece exercer um papel importante nas cicatrizações cutâneas e anastomoses. Também tem um papel fundamental na resposta imune. O equilíbrio desta relação simbiótica é determinante no controle e tratamento de doenças de pele, no processo de envelhecimento e de cicatrização. Estudos com preparações




**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Profª Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300  
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290  
Fax: (41) 317-3030  
ceua@up.com.br

simbióticas são escassos e alguns autores relatam a melhora da resposta imune em algumas patologias como dermatite atópica, psoríase e cicatrização de feridas cutâneas. O objetivo do presente trabalho será avaliar se o consumo de simbiótico via oral, melhora a cicatrização de feridas, em ratos. O trabalho terá 02 fases. A primeira será feito um estudo piloto com 01 animal, afim de confirmar todas as etapas do processo a ser seguido, como a indução à cicatrização, tipo de dieta, probiótico a ser utilizado, e avaliação das fases de cicatrização. Após confirmação do modelo, serão utilizados 60 ratos machos, da raça *Wistar*, que após período de aclimação serão pesados e divididos de forma randomizada em 06 grupos com 12 animais cada, de acordo com o tipo de suplementação a ser administrada: Grupo 1 - Ratos controle suplementados com maltodextrina avaliados no dia 3 de pós-operatório; Grupo 2 - Ratos com suplementação perioperatória de probiótico Probiatop® (Healthy Functional Nutrition Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.) avaliados no dia 3 de pós-operatório; Grupo 3 - Ratos controle suplementados com maltodextrina avaliados no dia 7 de pós-operatório; Grupo 4 - Ratos com suplementação perioperatória de probiótico Probiatop® (Healthy Functional Nutrition Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.) avaliados no dia 7 de pós-operatório; Grupo 5 - Ratos controle suplementados com maltodextrina avaliados no dia 10 de pós-operatório; Grupo 6 - Ratos com suplementação perioperatória de probiótico Probiatop® (Healthy Functional Nutrition Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.) avaliados no dia 10 de pós-operatório. Os animais terão seus pesos controlados no início do experimento, sete e dez dias após o início. A suplementação do probiótico será por via oral. Para a realização da cirurgia os animais serão anestesiados com indução anestésica por via inalatória, com anestésico inalatório (Isoflurano). A incisão será realizada com ajuda de um punch com 1,5 cm de diâmetro, para avaliação morfológica da contração da ferida e estudo de reepitelização. As feridas serão deixadas abertas para cicatrizar por segunda intenção. A analgesia pós-operatória será realizada com paracetamol na diluição de 4 gotas/100ml de água. No 3º, 7º e 10º dia pós-operatório, os animais serão eutanasiados em sistema fechado de campânula de vidro, com isoflurano. Imediatamente após a constatação do óbito, cada rato será submetido a retirada dos tecidos para avaliação. Serão avaliados os seguintes fatores: marcadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$  e IL-6) e anti-inflamatório (IL10) por imunohistoquímica; o grau de cicatrização epitelial nas 3 fases da cicatrização (inflamatória, proliferativa e de maturação) por histologia (HE); morfometria das cicatrizes em 3 tempos diferentes (primeiro, quinto e décimo quarto dia); avaliar ainda a densitometria do colágeno tipo I e II, através da coloração com *picrosirius-red*, relacionando-o com a expressão imunohistoquímica do KI-67 (marcador de proliferação celular); o peso dos animais em 3 tempos (início, 7 e 14 dias). A complexidade envolvida no processo de cicatrização torna a presente pesquisa experimental relevante.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Profª Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300

Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290

Fax: (41) 317-3030

ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 294

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)**

**COMENTÁRIOS DO RELATOR**

A CEUA sugere que após as cirurgias, os animais sejam colocados em caixas mais altas com o objetivo de evitar lesões no local da ferida por atrito com a grade de cobertura.

**PARECER**

Recomenda a Aprovação

**ANEXO 2 – ADENDO AO COMITÊ DE ÉTICA****ADENDO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Positivo,

Respeitosamente venho solicitar, por meio deste adendo, a alteração do produto utilizado no projeto: " **Suplementação perioperatória com simbiótico na cicatrização de feridas em ratos** " (PROTOCOLO CEUA 294).

Considerando os demais estudos da literatura, optou-se por utilizar o probiótico **Probiatop**<sup>®</sup> ao invés do simbiótico **Lactofos**<sup>®</sup>. O novo produto é fabricado pela mesma indústria, FARMOQUIMICA, inscrita no CNPJ sob no 33.349.473/003-10, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ sob no 33.349.473/003-10, situada à Rua Viúva Claudio, 300 – Jacaré – Rio de Janeiro – RJ

O **Probiatop**<sup>®</sup> é composto pelas mesmas cepas que o produto mencionado no projeto, **Lactofos**<sup>®</sup> (doses  $1 \times 10^9$  UFC/g)<sup>12</sup> *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup>, sendo que a única diferença é que a nova escolha de produto não contém frutooligossacarídeo FOS. O probiótico sem frutooligossacarídeo é melhor tolerado em doses maiores, além de avaliar isoladamente o efeito do probiótico. Motivo pelo qual, optamos pelo uso do mesmo.

Grata pela atenção.

ELIANE TAGLIARI

Ctba. 09.09.2015

### ANEXO 3 – LAUDO DESCRITIVO DA RAÇÃO

DIETA PADRÃO PRESENCE (PURINA\*) 7883 especial para dieta de ratos e camundongos e hamsters de laboratório, utilizada pelo Biotério da UP, conforme descrição do fabricante\*.

**Tabela 3 – TABELA DE COMPOSIÇÃO DIETA PADRÃO.\***

NUTRIENTES	COMPOSIÇÃO
Umidade	130 g/kg
Proteína bruta	230 g/kg
Extrato etéreo	40 g/kg
Fibra bruta	50 g/kg
Materia prima mineral	100 g/kg
Cálcio	13 g/kg
fósforo	8.500 mg/kg
Sódio	2.700 mg/kg
Magnésio	500 mg/kg
Ferro	180 mg/kg
Cobre	30 mg/kg
Manganês	110 mg/kg
Zinco	110 mg/kg
Iodo	1 mg/kg
Cobalto	2 mg/kg
Selênio	0,2 mg/kg
Vit. A	25.500 UI/kg
Vit. D 3	4.000 ui/kg
Vit E	82 UI/kg
Vit K3	6,4 mg/kg
Vit. B1	11 mg/kg
Vit B2	12 mg/kg

Vit. B3	219 mg/kg
Ácido pantotênico	90 mg/kg
Vit. B6	11 mg/kg
Vit. B9	13 mg/kg
Vit. B12	40 mg/kg
Biotina	0,1 mg/kg
Colina	1.800 mg/kg
Lisina	12,5 mg/kg
Metionina	3.500 mg/kg
Total (G)	1.000

\* Presence Nutrição Animal Ltda., Linha Animais de Pesquisa Científica.  
 Av. Professor Benedito Montenegro, S/N Betel – Paulínia. SP. CEP: 13148-189



### TERMO DE DOAÇÃO

FARMOQUIMICA, inscrita no CNPJ sob nº 33.349.473/003-10, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ sob nº 33.349.473/003-10, situada à Rua Viúva Claudio, 300 – Jacaré – Rio de Janeiro – RJ, neste ato, representada na forma do seu contrato social, vem através desta, realizar a doação de 130 sachês do produto Probiatop<sup>®</sup>, 130 sachês de placebo (maltodextrina) para o desenvolvimento do estudo intitulado **“suplementação perioperatória com probióticos na cicatrização de feridas em ratos”**, a ser realizado pela pesquisadora **ELIANE TAGLIARI** portador da Cédula de Identidade RG nº 3903398-4 e CPF/MF nº. 620.131.499-72, doravante denominada DONATÁRIA, a título de doutorado no Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica na Universidade Federal do Paraná, com as condições de que a DONATÁRIA se comprometa a seguir a todas as determinações legais, regulatórias e éticas referentes à pesquisa com animais, sendo a única responsável por todas as aprovações pertinentes, seguindo estritamente a todas as recomendações que lhe sejam transmitidas pelo CEUA “Comissões de Ética no Uso de Animais” e isentar a DOADORA de qualquer responsabilidade, razão pela qual em nenhuma circunstância a DOADORA poderá ser confundida com a figura de PATROCINADORA.

Rio de Janeiro, 09 de março de 2016

---

ELIANE TAGLIARI

Pesquisadora

---

FARMOQUIMICA S/A

#### FARMOQUÍMICA S.A.

**Matriz:** Av. José Silva de Azevedo Neto, 200 • Condomínio 02 • Ed. Evolution II • 1º andar  
Barra da Tijuca - RJ • CEP: 22775-056 • Tel.: (21) 2122-6100

**Escritório Comercial:** Rua Alexandre Dumas, 2220 • Conj. 22  
Chácara Santo Antônio - SP • CEP: 04717-004 • Tel.: (11) 2104-4940 • Fax: (11) 2104-4949

**Fábrica:** Rua Viúva Cláudio, 300 • Jacaré - RJ • CEP: 20970-032 • Tel.: (21) 2122-6000

[www.fqm.com.br](http://www.fqm.com.br)